

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN I
DIREKTOR: PROF. DR. MED. JÜRGEN SCHÖLMERICH

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Einfluss virulenter und avirulenter Isolate
von *Mycobacterium avium* auf die Zytokinsekretion,
Phagosomenreifung und Killingkapazität humaner
neutrophiler Granulozyten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Felix Sperl

2008

Dekan:

Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter:

PD Dr. Pia Hartmann

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Michael Pfeifer

Tag der mündlichen Prüfung:

22./23.12.2008

Gewidmet meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	9
1.1	HISTORISCHES	9
1.2	TAXONOMIE	11
1.3	EPIDEMIOLOGIE	13
1.3.1	<i>Umweltreservoir</i>	13
1.3.2	<i>Physiologische Charakteristika von M. avium</i>	13
1.4	KLINIK: INFEKTIONEN MIT M. AVIUM COMPLEX.....	14
1.4.1	<i>MAC Infektionen bei immunkompetenten Patienten</i>	15
1.4.2	<i>MAC Infektionen bei immunsupprimierten Patienten</i>	17
1.5	PATHOGENESE	21
1.6	IMMUNANTWORT.....	22
1.6.1	<i>Der Makrophage als Wirtszelle</i>	22
1.6.2	<i>Neutrophile Granulozyten und Mykobakterien</i>	27
1.7	ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	29
2	MATERIAL UND METHODEN.....	30
2.1	ZELLISOLIERUNG UND ZELLKULTUREN	30
2.1.1	<i>Neutrophile Granulozyten</i>	30
2.1.2	<i>Makrophagenkulturen</i>	31
2.2	MYKOBAKTERIEN	32
2.2.1	<i>Erstellen einer Stammbank von M. avium</i>	32
2.2.2	<i>Anreicherung und Sequenzierung der Isolate mit PCR</i>	38
2.2.3	<i>Bestimmung der Virulenz der Isolate</i>	40
2.3	INTRAZELLULÄRE ABTÖTUNG	41
2.4	ELISA (ENZYME LINKED IMMUNO-SORBENT ASSAY)	42
2.5	IMMUNFLUORESCENZ	42
2.6	SPENDERKOLLEKTIV	45
2.7	STATISTIK.....	45
3	RESULTATE.....	46
3.1	SEQUENZIERUNG DER ISOLATE MIT PCR	46
3.2	BESTIMMUNG DER VIRULENZ DER ISOLATE.....	46
3.3	EINFLUSS DER VIRULENZ AUF DIE INTRAZELLULÄRE ABTÖTUNG VON M. AVIUM DURCH NEUTROPHILE GRANULOZYTEN.....	49
3.4	ZYTOKININDUKTION DURCH M. AVIUM UNTERSCHIEDLICHER VIRULENZ IN NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN	50

3.5	EINFLUSS DER VIRULENZ VON <i>M. AVIUM</i> AUF DIE PHAGOSOMENREIFUNG VON NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN	55
4	DISKUSSION	59
4.1	EINFLUSS DER VIRULENZ AUF DIE INTRAZELLULÄRE ABTÖTUNG VON <i>M. AVIUM</i> DURCH HUMANE NEUTROPHILE GRANULOZYTEN.....	59
4.2	ZYTOKININDUKTION DURCH <i>M. AVIUM</i> UNTERSCHIEDLICHER VIRULENZ IN HUMANEN NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN	59
4.3	EINFLUSS DER VIRULENZ VON <i>M. AVIUM</i> AUF DIE PHAGOSOMENREIFUNG VON HUMANEN NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN	63
4.4	FAZIT UND AUSBLICK	66
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	68

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G-CSF	<i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i>
GRO	<i>human growth regulated peptide</i>
HAART	<i>highly active antiretroviral therapy</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IL-1ra	Interleukin-1-Rezeptorantagonist
kDa	kilo Dalton
LAMP	<i>lysosomal-associated membrane protein</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MAC	<i>Mycobacterium avium</i> complex
MCP	<i>monocyte chemotactic protein</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIG	<i>monokine induced by gamma-interferon</i>
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>
MW	Mittelwert
MOTT	<i>mycobacteria other than tuberculosis</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> (messenger Ribonukleinsäure)
NTM	<i>nontuberculous mycobacteria</i>
PBS	<i>phosphate buffered salt solution</i> (phosphatgepufferte

Salzlösung)

PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
PMNs	<i>polymorphonuclear leukocytes</i> (Neutrophile)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RPMI	Powdered Tissue Culture Medium
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
TGF	transforming growth factor
TNF	<i>tumor necrosis factor</i> (Tumor-Nekrose-Faktor)

1 EINLEITUNG

1.1 HISTORISCHES

Mykobakterien sind seit Jahrtausenden als humanpathogene Erreger von Bedeutung. Kaum einem Erreger wurde in der Geschichte der Medizin soviel Beachtung geschenkt wie *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium leprae*. Molekularbiologische Methoden lieferten Hinweise auf Erkrankungen durch *M. tuberculosis* in einer 3000 Jahre alten ägyptischen Mumie ¹. Die Lepra ist seit mindestens 600 v. Chr. in Indien als „Kushta“ bekannt. HIPPOKRATES (460-379 v. Chr.) prägte den Begriff der Phthisis und beschrieb damit die Lungenschwindsucht, den typischen körperlichen Verfall von Tuberkulosekranken, der nach unserem heutigen pathophysiologischen Verständnis der Wirkung des Tumor Nekrose Faktors (TNF) zugeschrieben wird. ARISTOTELES (384-322 v. Chr.) berichtete von der Skrofulose, der die tuberkulöse Lymphadenitis als klinischer Begriff der Gegenwart entspricht. Die Bibel beschreibt in Levitikus, dem dritten Buch Mose, ausführlich das Krankheitsbild der Lepra und wie mit den „Aussätzigen“ zu verfahren sei (Moses, Levitikus 13: 1-46) ². 1873 durch den norwegischen Mediziner GERHARD HENRIK ARMAUER HANSEN entdeckt, war *M. leprae* das erstbeschriebene humanpathogene Bakterium überhaupt.

Der französische Arzt SYLVIVS DE LE BOE (1614- 1672) entdeckte bei einer Autopsie die knötchenförmigen pathologischen Korrelate von *M. tuberculosis*, die Granulome, die er als „Tubercula“ bezeichnete. Schließlich gelang es ROBERT KOCH (1843- 1910), dem Begründer der modernen Bakteriologie, im Jahr 1882 den Erreger der „weißen Pest“, *M. tuberculosis*, zu identifizieren ³.

Im 12. Jahrhundert gab es in Europa etwa 19.000 Leprosorien, in denen die „Aussätzigen“ isoliert wurden. Und noch über die Entdeckung der ersten Antituberkulotika im Jahre 1943 hinaus, gab es zahlreiche Heilstätten und Sanatorien

für Tuberkulosekranke, eindrucksvoll beschrieben in Thomas Manns „Zauberberg“ (1924), die von der gesellschaftlichen und kulturellen Bedeutung dieser Erkrankungen zeugen.

Die klinische Bedeutung von *Mycobacterium avium* als humanpathogenem Erreger wurde erst im 20. Jahrhundert erkannt. Obwohl z.B. die durch *M. avium* oder *M. scrofulaceum* verursachte Lymphadenitis sicher seit Jahrhunderten vorkommt, haben bis zum Ausbruch der HIV-Pandemie die Mykobakterien jenseits von *M. tuberculosis* und *M. leprae* klinisch eine untergeordnete Rolle gespielt. Als Erreger der Vogeltuberkulose war *M. avium* bereits seit Jahrzehnten bekannt, als in den 40er Jahren die ersten Erkrankungsfälle beim Menschen beschrieben wurden⁴. Dabei entwickelten primär Patienten mit einer pulmonalen Prädisposition ein der Lungentuberkulose ähnliches Krankheitsbild. Insgesamt jedoch waren klinisch apparente Infektionen vor der AIDS-Ära selten, obwohl in den USA schon mehr als zehn Jahre vor dem durch AIDS bedingten Anstieg der Inzidenz von durch *M. avium* und anderen nicht tuberkulösen Mykobakterien verursachten Infektionen, eine Zunahme der Fallzahlen wie auch des Schweregrades der Erkrankungen zu beobachten war⁵. Die prädominanten klinischen Manifestationen waren chronische Lungenerkrankungen, juvenile zervikale Lymphadenitiden, Haut- und Weichteilinfektionen und Osteomyelitiden, meist nach traumatischen Verletzungen. Mitte der 80er Jahre traten diese Krankheitsbilder dann aufgrund der Häufigkeit der disseminierten Form der Erkrankung bei AIDS in den Hintergrund⁵. Die Einführung der hoch aktiven antiretroviralen Therapie führte zu einem deutlichen Rückgang von *M. avium* Infektionen in der Population HIV-infizierter Patienten, die jedoch gegenwärtig eine Renaissance erfahren^{6,7,8}. Im Zeitalter der Hochdosischemotherapie und der Organtransplantation spielt *M. avium* aber auch bei Patienten mit iatrogener Immunsuppression als opportunistischer Keim zunehmend eine Rolle^{9,10}.

1.2 TAXONOMIE

M. avium gehört phylogenetisch zu den grampositiven Organismen. Dem Genus *Mycobacterium*, welches das einzige Genus der Familie *Mycobacteriaceae* ist, lassen sich aktuell etwa 115 Arten unterordnen, von denen jedoch nur ungefähr 50 als humanpathogen gelten (LPSN=List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature [[www.bacterio.cict.fr /index.html](http://www.bacterio.cict.fr/index.html)]). Eine erste Einteilung der Familie *Mycobacteriaceae* erfolgte nach der von E.H. Runyon 1954 erstellten Klassifizierung, die auf der Wachstumsgeschwindigkeit der Mykobakterien und ihrer Fähigkeit, Pigmente zu bilden basiert ¹¹. In die heute verwendete modernere Einteilung finden die Wachstumsgeschwindigkeit und klinische Gesichtspunkte Eingang. Dabei wird zwischen langsam und schnell wachsenden Bakterien unterschieden, die dann wiederum unterteilt werden in

nicht pathogene, ubiquitär vorkommende, saprophytäre Mykobakterien, deren Nachweis ohne klinische Relevanz ist

fakultativ pathogene, ubiquitär vorkommende Mykobakterien, deren Nachweis insbesondere bei Vorliegen pathognomischer Krankheitszeichen und entsprechenden Risikofaktoren von klinischer Bedeutung ist

obligat pathogene, nicht ubiquitär vorkommende, weit gehend auf den Menschen als Wirt beschränkte Mykobakterien, deren Nachweis immer auch Behandlungsbedürftigkeit bedeutet

Langsam wachsende Mykobakterien benötigen länger als sieben Tage, um aus einem verdünnten Inokulum auf einem optimalen Nährboden zu sichtbaren Kolonien heranzuwachsen. Schnell wachsende Arten brauchen dazu weniger als sieben Tage. Insgesamt ist die Generationszeit von Mykobakterien im Vergleich zu anderen Bakterien mit medizinischer Bedeutung deutlich länger.

In der Gruppe der langsam wachsenden obligat pathogenen Mykobakterien werden unter Ausschluss von *M. leprae* die Arten *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii* und *M. microti* unter dem Begriff *Mycobacterium tuberculosis complex* zusammengefasst. Da bis in die 70er Jahre alle klinisch relevanten mykobakteriellen Infektionen typischerweise durch diese Gruppe verursacht waren, wurden alle anderen langsam wachsenden Mykobakterien als „Atypische“ bezeichnet. Obwohl dieser Begriff, der später zum Teil auch schnell wachsende Arten mit einbezog, auch in der jüngeren Literatur immer noch zu finden ist, kann er den Kriterien dieser großen heterogenen Gruppe kaum gerecht werden. Konsequenterweise sind im englischen Sprachraum andere Begriffe wie nontuberculous mycobacteria (NTM) oder mycobacteria other than tuberculosis (MOTT) geprägt worden¹². Eine begrifflich korrekte und kurze Bezeichnung ist „ubiquitäre Mykobakterien“, da für fast alle Spezies Umweltquellen nachgewiesen werden konnten. Ob all diese Spezies im weiteren Sinne des Wortes tatsächlich ubiquitär vorkommen, ist allerdings in Frage zu stellen, da die heterogene Physiologie dieser Arten ihre Ökologie und geographische Verteilung determiniert^{13,14,15}. *M. avium* mit seinen vier Subspezies *avium*, *paratuberculosis*, *silvaticum* und *hominisuis* wird zusammen mit *M. intracellulare* im *M. avium Complex* (MAC) zusammengefasst. Obwohl heute noch regelmäßig angewandt, ist dieser Begriff fast historisch, da er aus einer Zeit stammt, als die Speziesdifferenzierung noch mittels der Serotypisierung vorgenommen wurde¹⁶. Demnach schließt der *M. avium Complex* 28 Serovare ein. Die Serotypisierung ist jedoch mit der Standardisierung und allgemeinen Verfügbarkeit höher auflösender molekularbiologischer Methoden in den Hintergrund getreten¹⁷. Man spricht heute daher auch von Genomospezies im Vergleich zu Serospezies. Insgesamt unterliegt die Taxonomie der *Mycobacteriaceae* nicht zuletzt aufgrund dieser neuen Typisierungsmöglichkeiten der Spezies einem ständigen Wandel.

1.3 EPIDEMIOLOGIE

Die Epidemiologie von *M. avium* Infektionen ist unmittelbar mit der Verbreitung des Erregers in den Umweltreservoirien bestimmter Regionen und der Disposition des infizierten Wirtes assoziiert.

1.3.1 UMWELTRESERVOIRE

Ubiquitäre Mykobakterien, wie die Spezies des *Mycobacterium avium Complex*, repräsentieren unter ökologischen Gesichtspunkten eine sehr interessante Gruppe. Sie besitzen Eigenschaften, die sie befähigen, in natürlichen Biotopen zu leben, ohne ihre Pathogenität für bestimmte animalische und humane Lebensformen zu verlieren. Einige Stämme induzieren Infektionen über diese natürlichen Biotope, die in dem Fall als Reservoirie in der Transmissionskette erachtet werden können. Ungeachtet ihrer Pathogenität ähneln ubiquitäre Mykobakterien in mehrerer Hinsicht den Saprophyten: Sie wachsen in einem breiten Temperaturspektrum, *M. avium* und *M. intracellulare* wachsen in einem Temperaturbereich von 10°C-45°C, und haben eine schnelle Anpassungsfähigkeit an neue Substrate¹⁸. Aquatische Ökosysteme bieten einen großen Lebensraum für MAC. So findet sich MAC in natürlichen Gewässern, in aufbereitetem Trinkwasser, in öffentlichen Schwimmbädern und Whirlpools, in Warmwassersystemen von Krankenhäusern, in Abwässern und im Kühlwasser der Metall verarbeitenden Industrie, das aufgrund seiner organischen Zusammensetzung einen hervorragendes Biotop für MOTT darstellt^{19,20,21,22,23,24,25}. Darüber hinaus wurde *M. avium* in Erde, Milch und anderen Nahrungsmitteln nachgewiesen²⁶.

1.3.2 PHYSIOLOGISCHE CHARAKTERISTIKA VON M. AVIUM

M. avium und andere MOTT verfügen über besondere physiologische Eigenschaften, die ihr Überleben und ihre Vermehrung innerhalb aquatischer Biofilme gewährleisten. Dazu gehört nicht nur die Fähigkeit unter oligotrophen Bedingungen in einem weiten

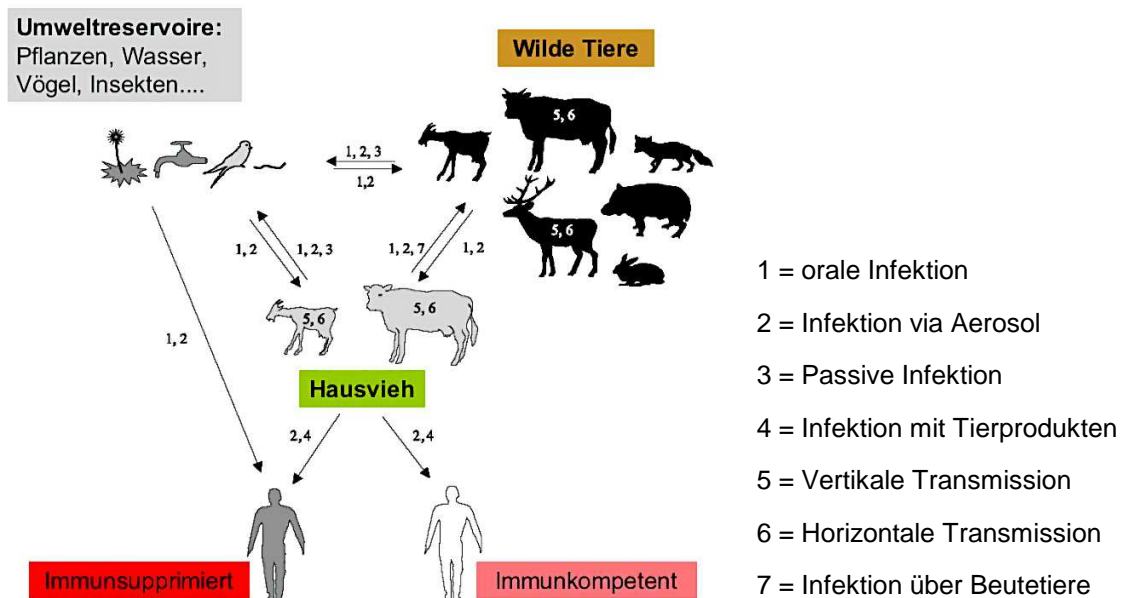
Temperaturbereich zu wachsen, sondern auch ihre fettsäure- und wachsreiche undurchlässige Zellwand, deren hydrophobe Oberflächeneigenschaften den Bakterien die Adhärenz an solide Substrate (z. B. Rohre oder Blätter) in aquatischen Lebensräumen ermöglichen^{25,27,28,29}. Die besondere Zellwandstruktur von Mykobakterien ist auch verantwortlich für ihre extreme Resistenz gegenüber Desinfektionsmitteln, die für die Aufbereitung von Wasser verwendet werden, wie Chlor oder Ozon. So ist *M. avium* etwa 500mal resistenter gegenüber Chlor als *Escherichia coli*³⁰. Dadurch entsteht bei der Desinfektion der gemischten Mikroflora in Trinkwasser und Nutzwasser, wie in Schwimm- oder Heilbädern, ein Selektionsvorteil für *M. avium* und andere MOTT, die sich aufgrund der Eradikation anderer desinfektionssensibler Nährstoffverwerter umso besser vermehren können^{30,31}. Ein weiterer Vorteil ist die relative Hitzestabilität von Mykobakterien, so kann *M. avium* über eine Stunde bei 55°C überleben^{22,32}. *M. avium* und *M. intracellulare* können darüber hinaus in anderen Residenten der aquatischen Ökosysteme, wie phagozytischen Amöben und Protozoen, überleben und es gibt erste Hinweise darauf, dass die intrazelluläre Persistenz in diesen Organismen zu einer Virulenzsteigerung von *M. avium* führt^{33,34}.

1.4 KLINIK: INFEKTIONEN MIT M. AVIUM COMPLEX

Aufgrund seiner breiten Präsenz in der Umwelt und seiner Pathogenität für Menschen und Tiere ergeben sich viele Transmissions- und Infektionswege für *M. avium* zwischen der Umwelt, wilden Tieren, Hausvieh und dem Menschen (Abb. 1 modifiziert nach³⁵).

Abbildung 1-1

Transmissions- und Infektionswege für *M. avium* Complex



Das Risiko an einer MAC Infektion zu erkranken, korreliert mit der Expositionshäufigkeit und -zeit sowie mit der Disposition des Wirtes. So muss grundsätzlich zwischen Infektionen bei immunkompetenten und immunsupprimierten Patienten unterschieden werden.

1.4.1 MAC INFektionen BEI IMMUNKOMPETENTEN PATIENTEN

Insgesamt steigt die Prävalenz von MAC Infektionen bei immunkompetenten Patienten ^{36,37}. Dies mag daran liegen, dass MAC als potentieller Erreger pulmonaler Infektionen bei Patienten mit diversen Prädispositionen zunehmend mehr Beachtung findet, ein weiterer möglicher Grund ist die Alterung der Gesellschaft ³⁸. Alte Menschen erkranken signifikant häufiger als junge, und pulmonale Prädispositionen, wie Bronchiektasen, COPD, Silikose und die zystische Fibrose, sind ein bedeutender Cofaktor für MAC Infektionen ^{39,40,41}.

Bei immunkompetenten Patienten ist in der Mehrzahl der Fälle die Lunge betroffen, und klinisch wie auch radiologisch werden hier drei Formen der Präsentation in unterschiedlichen Kollektiven unterschieden.

Pulmonale *M. avium* Infektionen auf dem Boden prädisponierender Lungen-erkrankungen treten häufiger bei älteren Männern mit einer Anamnese von Tabak- und/oder Alkoholabusus auf ^{42,43}. Typische radiologische Veränderungen sind Rundherde in den oberen Lungenfeldern mit kavernösen Veränderungen¹².

Die fibronoduläre Bronchiektasie betrifft schlanke Frauen ohne pulmonale Vorerkrankungen im mittleren bis hohen Alter. Typischerweise sind hier der rechte Mittellappen und die Lingula betroffen. Knötchenartige Rundherde und Bronchiektasen werden meist zeitgleich apparent⁴⁴. REICH führte für dieses klinische Bild den Begriff „Lady Windermere Syndrom“ ein. In Anlehnung an Oscar Wildes Bühnenstück „Lady Windermere's Fächer“ bezeichnete er damit die Kombination der typischen radiologischen Befunde und einer vermeintlich vornehmen, habituellen Hustenunterdrückung der betroffenen Patientinnen ⁴⁵.

Die dritte pulmonale Manifestation von MAC ist die hypersensitive Pneumonitis. Sie zeigt keine spezielle Alters- oder Geschlechtsverteilung, sondern betrifft vorwiegend Personen, die eine intensive Exposition zum natürlichen Lebensraum von MAC, dem Wasser, haben. Durch das beständige Einatmen von Aerosolen erkranken bestimmte Berufsgruppen, wie Arbeiter in der Metall verarbeitenden Industrie (Kühlwasser) oder Bademeister an der hypersensitiven Pneumonitis⁴⁶. Die ersten Symptome können Grippe-ähnlich sein mit Fieber, Schüttelfrost, Kopfschmerzen, einem allgemeinen, schweren Krankheitsgefühl und Husten. Chronifiziert die Erkrankung, stellen sich zudem Dyspnoe und Gewichtsverlust ein. Der radiologische Befunde zeigt typischerweise multiple kleine Rundherde, die über alle Lungenfelder verteilt sind.

Insgesamt ist das klinische Bild der pulmonalen MAC Infektion von dem der Tuberkulose oft nur schwer abgrenzbar. Die Symptome lang persistierender Husten, Auswurf, Hämoptysen, Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsabnahme können in unterschiedlicher Ausprägung und Kombination auftreten^{37,46}.

Als Resident in der Wasserversorgung von Krankenhäusern ist MAC auch ein bedeutender nosokomialer Keim. Dabei ist hier nicht nur die Infektion durch Aerosole von Bedeutung, sondern auch die Infektion mit Injektions- oder Operationsbestecken, die vor der Sterilisation mit Leitungswasser gereinigt wurden. Die Folgen dieser nosokomialen Infektionen sind u.a. Tendovaginitis, Osteomyelitis, Otitis media und Peritonitis^{47,48}. Die MAC Infektion bei Immunkompetenten mit der günstigen Prognose ist die bei Kleinkindern vorkommende cervikale, submandibuläre, submaxilläre oder präaurikuläre Lymphadenitis. Dabei handelt es sich um eine unilaterale, nicht schmerzhafte, rasch progrediente Lymphknotenschwellung, die in der Regel ohne systemische Symptome verläuft¹².

1.4.2 MAC INFEKTIONEN BEI IMMUNSUPPRIMIERTEN PATIENTEN

MAC ist ein opportunistischer Keim bei Patienten mit angeborenen Immundefekten oder iatrogener Immunsuppression im Rahmen von malignen Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen oder nach Organtransplantationen. So sind 25-40% aller mykobakteriellen Infektionen bei Transplantatempfängern durch MOTT verursacht⁴⁹.

Seine größte Bedeutung als Erreger bei immunsupprimierten Patienten erlangte MAC jedoch im Rahmen der AIDS-Pandemie. Vor Einführung der HAART war die Infektion mit MAC die häufigste bakterielle opportunistische Infektion bei HIV-infizierten Patienten in den Industrieländern mit einer Frequenz von jährlich 10-20% der Patienten im Stadium AIDS. Die mediane Überlebenszeit von Patienten mit einer unbehandelten HIV-assoziierten MAC Infektion beträgt 107-134 Tage^{50,51,52}. Eine Kombinationstherapie von Antibiotika unter Einschluss von Clarithromycin und HAART

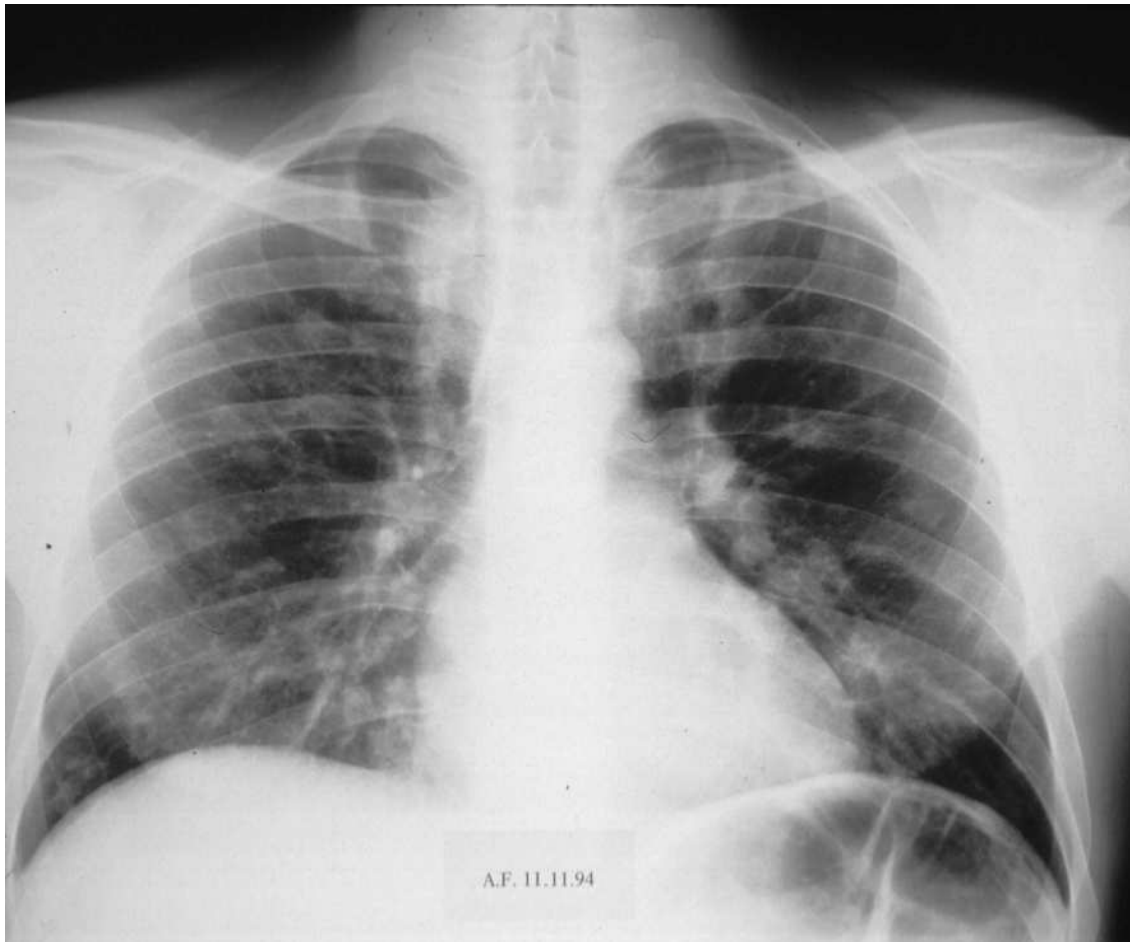
unter Einschluss eines Proteaseinhibitors haben wesentlich zur verbesserten Prognose der Patienten beigetragen.

Die bedeutendsten Risikofaktoren für die Entwicklung einer disseminierten Infektion mit MAC sind eine CD4 Zellzahl < 100/ ml und eine stattgehabte Kolonisation der Schleimhäute mit MAC. Das Risiko an einer MAC Infektion zu erkranken, steigt bei einer CD4 Zellzahl von < 100 / ml auf 15- 24%, bei < 10 / ml auf 39%^{53,54}. Im Gegensatz zu der primär lokalen pulmonalen Manifestation von MAC bei den immunkompetenten treten pulmonale Affektionen überhaupt nur mit einer Frequenz von 2-10% auf⁵⁵. Disseminierte MAC Infektion tragen wesentlich zur AIDS-Morbidität und Mortalität bei⁵⁶.

Das klinische Bild der disseminierten MAC Infektion ist geprägt durch den multiplen Organbefall der Patienten und intermittierenden hochfebrilen, bakteriämischen Phasen. Die Allgemeinsymptome Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsabnahme sind schwerwiegender als bei Immunkompetenten und der multiple Organbefall führt zu organspezifischen Dysfunktionen, wie Zytopenie (Knochenmark, Milz), Transaminasen-erhöhung und Ikterus (Leber, Galle) etc.. Typisch für die disseminierte MAC-Infektion sind diffus verteilte Lymphknotenschwellungen, die sich nicht nur im Abflussbereich der betroffenen Organe befinden⁵⁷. Die Abbildung 1-2 bis 1-4 zeigen einige beispielhafte radiologische Befunde eines AIDS-Patienten der Universitätsklinik Köln mit kulturell nachgewiesener, disseminierter *M. avium* Infektion.

Abbildung 1-2

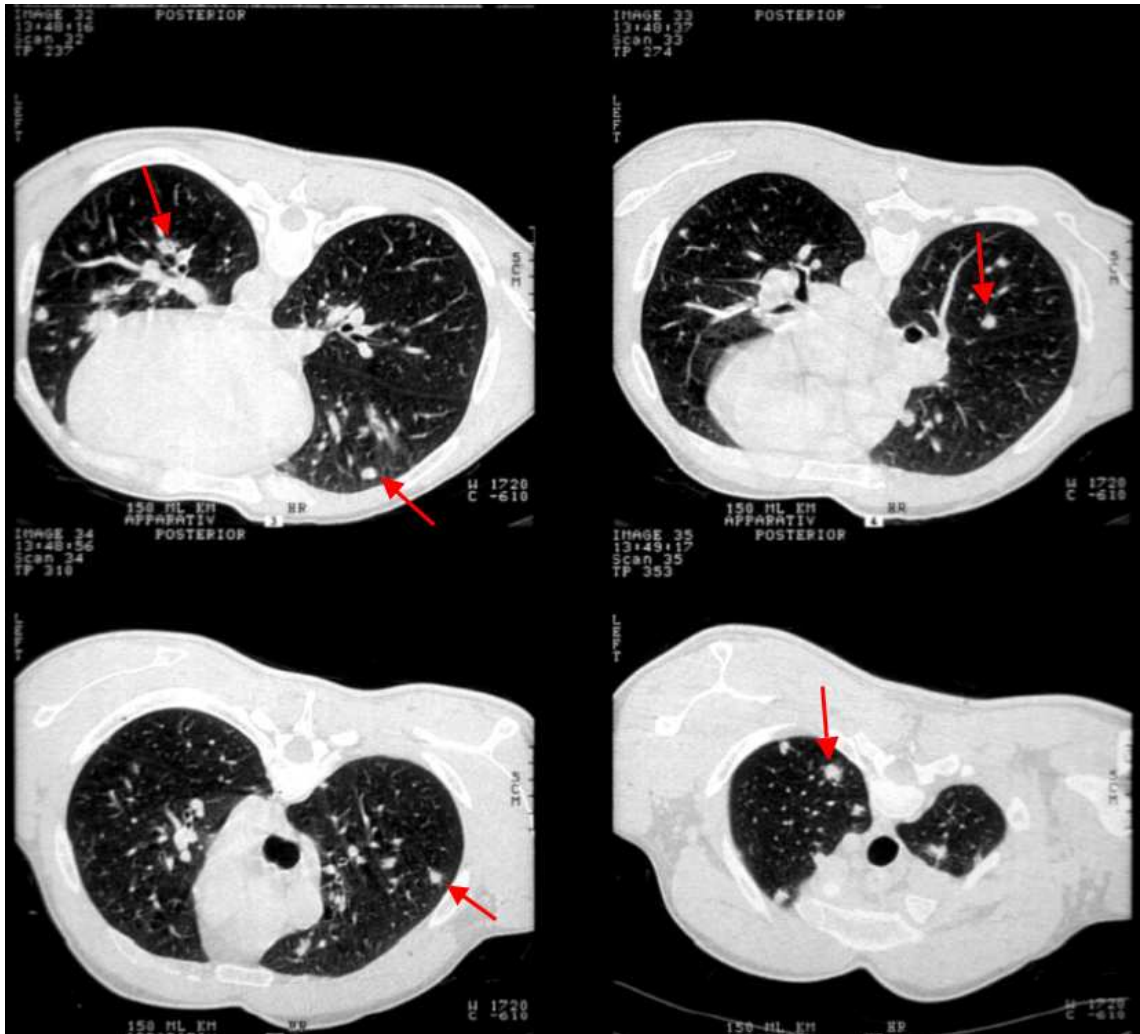
Thorax a.p. Röntgenaufnahme bei disseminierter *M. avium* Infektion



Diffuse, fleckige Zeichnungsvermehrung mit perihilärer Betonung bei einem 33 jährigen AIDS-Patienten, CD4+ Zellzahl < 10/ μ l. Fieber bis 39°C über einen Zeitraum von mehreren Wochen, Diarrhoe mit einer Frequenz von etwa 6/Tag, Gewichtsverlust von > 2kg/Woche.

Abbildung 1-3

Thorax-CT bei disseminierter *M. avium* Infektion



Multiple, kleine bis mittelgroße, rundliche Lungenherde (Pfeile). Außerdem mediastinal und axillär beidseits vergrößerte Lymphknoten ($\varnothing < 1$ cm).

Abbildung 1-4

Abdomen-CT bei disseminierter *M. avium* Infektion



Multiple mesenteriale und retroperitoneale Lymphknoten (Pfeile : LK mit $\varnothing > 2$ cm).

1.5 PATHOGENESE

Wie bereits unter 1.4 beschrieben können im Hinblick auf die Infektionswege Variationen zwischen immunkompetenten und immundefizienten Individuen ausgemacht werden, die den Unterschieden in der Virulenz und des Tropismus der einzelnen Arten und Unterarten von MAC zugeschrieben werden.

Die Infektion bei Immunkompetenten erfolgt fast ausschließlich durch Aerosole von Wasser, die in den Alveolarraum gelangen⁴⁶. Bei immunsupprimierten Individuen

kommt der pulmonalen Aufnahme von MAC über Aerosole als Infektionsweg nur eine sekundäre Rolle zu⁵⁸. Hingegen scheint die Infektion mit MAC der immunsupprimierten Population primär über eine Ingestion mit nachfolgender Invasion des Intestinaltraktes zu erfolgen. Entsprechend resistent ist MAC gegenüber Magensäure und Galle⁵⁹. *M. avium* infiziert die intestinale Mukosa des terminalen Ileums primär über die apikale Oberfläche der Epithelzellen. In den Epithelzellen exprimiert *M. avium* dann einen invasiven Phänotyp, der weitere intestinale Mukosazellen oder Makrophagen in der Submukosa mit einer vielfach höheren Effizienz penetrieren kann⁶⁰. Die Mechanismen, wie *M. avium* die Schleimhautbarriere überwindet und Makrophagen in der Lamina propria infiziert, sind nicht vollständig geklärt. Die Disseminierung der Infektion erfolgt lymphatisch über die regionalen Lymphbahnen in deren ansässigen Lymphknoten *M. avium* weitere Makrophagen infiziert, die dann als Wirtszellen für die weitere Replikation des Bakteriums dienen. Zeitgleich kann die hämatogene Streuung des Erreger und somit der Multiorganbefall erfolgen⁵⁸.

1.6 IMMUNANTWORT

1.6.1 DER MAKROPHAGE ALS WIRTSZELLE

M. avium ist ein fakultativ intrazellulärer Erreger, dem vorzugsweise Makrophagen und Monozyten als Wirtszellen dienen, der aber auch in nicht professionellen Phagozyten persistieren kann. Die Fähigkeit virulenter Mykobakterien, in Makrophagen zu persistieren und sich zu vermehren ist ein pathogenetisches Prinzip, das für die durch Mykobakterien verursachten Erkrankungen und die therapeutischen Ansätze zur Behandlung derselben von weit reichender Bedeutung ist¹².

1.6.1.1 Adhäsion und Phagozytose

M. avium wird durch Makrophagen via Rezeptor-vermittelten Phagozytose internalisiert. Diese erfolgt hauptsächlich über den Komplementrezeptor CR3. Die Fc-rezeptorunabhängige Phagozytose über Komplementrezeptoren und Integrine führt nicht zur Freisetzung von Sauerstoffradikalen durch den Makrophagen⁶¹. Ob allerdings bei der Rezeptor-vermittelten Phagozytose von *M. avium* die Art des Rezeptors, der den Eintritt in die Zelle vermittelt, einen Vorteil für die Etablierung der Mechanismen bietet, die dem Bakterium die intrazelluläre Persistenz ermöglichen, ist noch ungeklärt.

1.6.1.2 Resistenz gegenüber intrazellulärer Abtötung

Aufgrund verschiedener noch nicht vollends verstandener Mechanismen können virulente Mykobakterien der intrazellulären Abtötung durch Makrophagen entgehen, intrazellulär persistieren und sich vermehren. Durch den oben beschriebenen Fc-Rezeptor unabhängigen Eintritt in die Zelle entgeht *M. avium* den sauerstoffradikalabhängigen Killing-Mechanismen der Makrophagen.

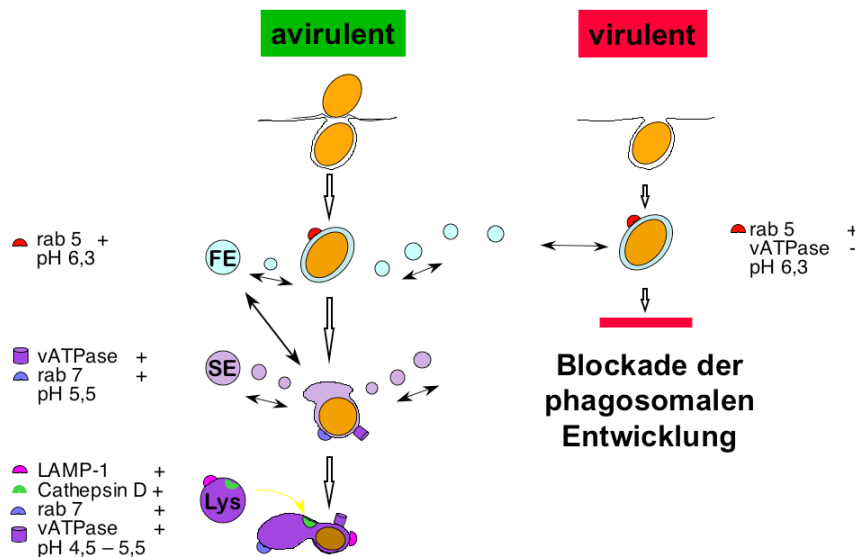
Unmittelbar nach der Phagozytose durch Makrophagen sind Pathogene in einem Phagosom eingeschlossen, das extrazelluläres Medium enthält und dessen Membranbestandteile zunächst denen der Plasmamembran entsprechen. Phagosomen sind jedoch dynamische Strukturen, die in ihrer Formation mit verschiedenen Organellen des endosomalen Netzwerkes interagieren und dabei Membranabschnitte und luminalen Inhalte austauschen. Dabei ist diese sequentielle Interaktion zwischen Phagosom und Endosomen ein kontinuierlicher Reifungsprozess an dessen Ende das Phagolysosom steht^{62,63}. Letzteres besitzt die Kapazitäten, die für die erfolgreiche Degradierung des Pathogens erforderlich sind. Dazu gehören ein sehr niedriger pH-Wert, hydrolytische Enzyme, andere bakterizide Peptide und die Fähigkeit zur Generierung toxischer Sauerstoffradikale⁶⁴. Es wird postuliert, dass virulente Mykobakterien die Phagosomenentwicklung auf der Interaktionsstufe mit dem

frühen Endosom „einfrieren“ können, so dass die Dynamik des Phagosomenreifungsprozesses empfindlich gestört und die Bildung eines funktionellen Phagolysosoms verhindert wird (Abb. 2). Dazu bedienen sich die Mykobakterien unterschiedlicher „Strategien“, in die zahlreiche Moleküle der Wirtszelle und des Bakteriums selbst involviert sind. Coronin 1 soll, assoziiert mit mykobakteriellen Phagosomen die Fusion verhindern⁶⁵. Weiter wird postuliert, dass pathogene Mykobakterien mit der Synthese von Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI3P) interferieren⁶⁶. Dieses regulatorische Lipid wird auf frühen endosomalen und phagosomalen Membranen synthetisiert und ist essentiell für die phagolysosomale Biosynthese, da es unter anderem als Ligand für zahlreiche Proteine fungiert, die in den phagolysosomalen Reifungsprozess involviert sind^{66,67,68,69,70}. Ein PI3P-Analogon gebildet von *Mycobacterium tuberculosis*, glykosylierte Phosphatidylinositol-Lipoarabinomannan (manLAM) konkurriert wahrscheinlich mit PI3P an der Bindungsstelle⁷¹.

Der kontinuierliche Austausch von luminalen Inhalten und Membranabschnitten zwischen dem Phagosom und verschiedenen Organellen, vor allem Endosomen, führt zu spezifischen morphologischen und metabolischen Charakteristika der Vakuolen in den verschiedenen Stadien der Phagolysosomenreifung. Beispielhaft ist hier die Membran-Assoziation der GTPasen der Rab Familie, die neben anderen Proteinen als Determinanten der Selektivität dieses Austauschprozesses angesehen werden⁷². So ist Rab5 ein früher endosomaler Marker, der sich in der weiteren Entwicklung des Phagosoms nicht mehr nachweisen lässt, während Rab7 und Rab9 neben LAMPs (lysosomal-associated membrane proteins) typische späte endosomale/lysosomale Marker repräsentieren⁷³ (Abb. 2).

Abbildung 2

Phagosomale Prozessierung von avirulenten und virulenten Mykobakterien



Im Prozess der Phagozytose schnürt sich ein Stück der Plasmamembran der Zelle ab und umschließt das Mykobakterium als Phagosom. In einer sequentiellen Interaktion zwischen Phagosom und Endosomen unterschiedlicher Entwicklungsstufen werden Membranabschnitte und luminalen Inhalte ausgetauscht, was zu spezifischen morphologischen und metabolischen Charakteristika der phagosomalen Vakuolen im Verlauf des Reifungsprozesses führt. Die Vakuole mit avirulenten Mykobakterien entwickelt sich zum Phagolysosom in dem das Bakterium dann schließlich degradiert wird. Pathogene Mykobakterien hingegen können diesen dynamischen Prozess auf einer frühen Stufe „einfrieren“.

Abk.: FE = frühes Endosom; SE = spätes Endosom; Lys = Lysosom; rab5 und rab7 = GTPasen der Rab Familie; LAMP = *lysosomal-associated membrane proteins*; vH⁺-ATPase = membranständige ATP-abhängige Protonenpumpe der phagosomalen Vakuole.

Der Austausch der luminalen Inhalte führt zu einer zunehmenden Ansäuerung des Phagosoms. Das saure Milieu des Phagolysosoms mit einem pH von 4,5-5,0 ist die Voraussetzung für eine optimale Funktion der hydrolytischen Enzyme (z.B. Cathepsin D), die für die Degradierung der Pathogene essentiell sind⁷⁴. Der Erhalt des sauren Milieus wird durch membranständige ATP-abhängige Protonenpumpen der phagosomalen Vakuole, vH⁺-ATPasen, gewährleistet. Virulente Mykobakterien verhindern die Ansäuerung der Phagosomen, und letztere weisen einen Mangel bzw. das vollständige Fehlen von vH⁺-ATPasen auf⁷⁵. Wie pathogene Mykobakterien auf den Säurehaushalt der Phagosomen Einfluss nehmen, ist Gegenstand intensiver Untersuchungen.

1.6.1.3 Zelluläre Immunität und die Bedeutung der Zytokine bei der mykobakteriellen Infektion.

Mykobakterien sind ein klassisches Beispiel für Erreger, deren aktive Bekämpfung seitens des Wirtes fast ausschließlich von der zellvermittelten Immunität abhängt. Sie sind intrazelluläre Erreger die vornehmlich in Makrophagen persistieren und es sind daher T-Zell-Effektor-Mechanismen und nicht eine klassische Antikörperantwort, die eine Kontrolle oder Elimination der Bakterien gewährleisten.

Alveolarmakrophagen präsentieren nach Infektion die prozessierten Antigene den T-Lymphozyten. So kommt es zur Proliferation von CD4-Zellen welche Zytokine vom T_H1-Typ ausschütten und sich an der MHC-Klasse II-vermittelten Zerstörung infizierter Zellen beteiligen⁷⁶.

Ebenso ist eine Antigenpräsentation über MHC Klasse I beschrieben, jedoch bleibt unklar wie diese stattfindet, da sie eine Freisetzung mykobakterieller Antigene in das Zytosol voraussetzt⁷⁷. Es gibt Hinweise auf Poren im Phagosom, die möglicherweise einen Transfer von mykobakteriellen Antigenen in das Zytosol erlauben⁷⁸. Eine MHC Klasse I-vermittelte Aktivierung von CD8-T-Helferzellen soll bei der Bekämpfung der Infektion ebenso eine Rolle spielen⁷⁹.

Der durch die Zytokine der T-Helferzellen aktivierte Makrophage setzt wiederum TNF- α frei, das synergistisch mit IFN- γ zur weiteren Stimulation des Makrophagen führt, so dass hier ein autokriner Aktivierungsmechanismus vorliegt, der ebenfalls für IL-1 β beschrieben ist⁸⁰. Insgesamt basiert die immunologische Kontrolle pathogener Mykobakterien auf einer Th-1 Zellantwort, repräsentiert v.a. durch die Zytokine IFN- γ und TNF- α ⁸¹. Dabei induzieren Mykobakterien in Makrophagen eine so starke IL-12 Antwort⁸², dass IL-12 als Gegenspieler des IL-4 die T-Zellproliferation in Richtung des TH-1 Typs dirigiert⁸³.

Dementsprechend könnte die Persistenz von *M. avium* in Makrophagen durch die gegenregulatorischen Th-2 Zytokine bedingt sein. Transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1)⁸⁴, IL-10⁸⁵ und IL-6⁸⁶ gehören zu den Zytokinen, für die eine Hemmung der Th-1 Zytokine bei intrazellulären Infektionen beschrieben wurde.

1.6.2 NEUTROPHILE GRANULOZYTEN UND MYKOBAKTERIEN

Neutrophile Granulozyten sind die erste Linie der Verteidigung gegen mikrobielle Pathogene, dennoch wurde ihnen lange Zeit keine Bedeutung bei Infektionen mit intrazellulären Erregern zugeschrieben. In den letzten Jahren gab es allerdings vermehrt Hinweise, dass neutrophile Granulozyten in die unspezifische Abwehr von Mykobakterien, aber auch von anderen intrazellulären Erregern, wie *Listeria monocytogenes* und *Salmonella typhimurium* involviert sind^{87,88}.

1.6.2.1 Unspezifische granulozytäre Immunantwort auf Mykobakterien im Tiermodell

Bereits 1932 zeigten *Vorwald* et al. bei Kaninchen, die intravenös mit humanen Tuberkelbakterien infiziert wurden, dass in der frühen Phase der pulmonalen Immunantwort fast ausschließlich granulozytäre Zellen nachweisbar waren⁸⁹. Die Phagozytose von atypischen Mykobakterien durch Granulozyten im Mausmodell wurde von verschiedenen Gruppen gezeigt^{90,91}. C57BL/6-Mäuse, deren „beige“-Mutante eine reduzierte Neutrophilenaktivität aufweist, zeigen im Vergleich mit dem Wildtyp eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Infektionen mit *M. avium* und *M. tuberculosis*, die sich pathologisch mit einer ausgeprägten Lebermanifestation präsentieren. Die Empfindlichkeit für *M. avium* kann durch die Transfusion von Neutrophilen des Wildtyps reduziert werden. Im Mausmodell für die *M. avium* Infektion sind neutrophile Granulozyten in der frühen Infektionsphase für die Kontrolle des Bakterienwachstums

von Bedeutung, während eine Granulozytendepletion in der späten Infektionsphase keine Auswirkung mehr auf das Bakterienwachstum hat⁹². Eine ähnliche zeitliche Abhängigkeit für die Effektivität der Granulozyten konnte bei der pulmonalen Tuberkulose im Rattenmodell gezeigt werden⁹³.

Versuche im Mausmodell ergaben auch erste Hinweise auf eine mögliche Kooperation von Granulozyten und Makrophagen in der Immunantwort auf atypische Mykobakterien. Die Lunge und die regionalen Lymphknoten von mit *M. avium* infizierten Mäusen zeigten eine Infiltration mit Makrophagen, die nicht nur säurefeste Stäbchen, sondern auch Lactoferrin neutrophilen Ursprungs enthielten⁹¹.

Als Antwort auf den direkten Kontakt mit *M. avium* sezernieren murine neutrophile Granulozyten TNF- α , IL-1 β , IL-12⁹⁴. Über die Induktion weiterer Zytokine gibt es nur wenige Untersuchungen.

1.6.2.2 Unspezifische humane granulozytäre Immunantwort auf Mykobakterien

Eine entscheidende klinische Beobachtung bezüglich der Bedeutung humaner neutrophiler Granulozyten in der Immunantwort auf MAC wurde 1998 durch eine große retrospektive Studie erbracht, die einen signifikanten Überlebensvorteil für HIV-infizierte Patienten mit atypischen Mykobakteriosen zeigte, die neben ihrer konventionellen Therapie zusätzlich mit dem Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor, G-CSF, behandelt wurden⁹⁵. Dieser Effekt kann letztendlich nur auf einer Funktionssteigerung der Neutrophilen beruhen, da G-CSF keinen Effekt auf Monozyten/Makrophagen oder auf Lymphozyten hat.

Die unspezifische Immunantwort humaner neutrophiler Granulozyten auf Kontakt mit Pathogenen ist bestimmt durch ihre spezifischen funktionellen Eigenschaften: Adhärenz, die Freisetzung toxischer Sauerstoffradikale, Chemotaxis, Phagozytose und

intrazelluläre Abtötung von Erregern. Diese funktionellen Eigenschaften sind in Bezug auf Mykobakterien bisher wenig untersucht.

Die Kapazität humaner neutrophiler Granulozyten, Mykobakterien intrazellulär abzutöten, wird auch in der jüngeren Literatur sehr kontrovers diskutiert. Während einige Autoren den Granulozyten keine oder lediglich eine immunmodulatorische Funktion im Prozess der Eliminierung der Mykobakterien durch Makrophagen zuschreiben^{96,97}, haben andere die direkte intrazelluläre Abtötung unterschiedlicher Spezies von Mykobakterien zeigen können^{98,99,100}. Weniger umstritten ist die Tatsache, dass Mykobakterien unter opsonisierten und nicht opsonisierten Bedingungen von Granulozyten phagozytiert werden^{100,101,102,103,104,105}.

1.7 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Die Fähigkeit virulenter Mykobakterien, in Makrophagen zu persistieren und sich dort zu vermehren ist ein bekanntes pathogenetisches Prinzip¹². Eine differentielle Expression von Zytokinen durch Makrophagen nach Phagozytose von virulenten versus avirulenten Mykobakterien wurde beschrieben⁷⁷⁻⁸⁴.

Die Rolle neutrophiler Granulozyten in der Immunantwort auf Mykobakterien ist weitgehend ungeklärt. In Vorarbeiten zu den hier vorgestellten Untersuchungen konnte die Phagozytose und intrazelluläre Abtötung eines avirulenten Vogelisolates von *M. avium* gezeigt werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das phagosomale Schicksal von virulenten und avirulenten *M. avium* Isolaten aus unterschiedlichen Reservoiren in Assoziation zur differentiellen Zytokininduktion zu untersuchen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 ZELLISOLIERUNG UND ZELLKULTUREN

2.1.1 NEUTROPHILE GRANULOZYTEN

Für die verschiedenen Experimente wurden 2 verschiedene Methoden zur Separierung von Granulozyten aus Vollblut eingesetzt.

Zellisolierung I:

18 ml Dextran 70 / 0,9% NaCl (Longasteril®70, Fresenius Kabi), 2 ml Citrat-Dextrose (Sigma) und 20 ml Vollblut eines gesunden freiwilligen Spenders wurden in einer 50 ml Perfusorspritze vorsichtig durchmischt. In der senkrecht aufgestellten Spritze sedimentierten die Erythrozyten für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Der granulozytenreiche Überstand wurde über eine Butterfly-Kanüle in ein 50 ml Falconröhrchen überführt, im Verhältnis 1:1 mit Ficoll-Paque™ Plus (Amersham Biosciences) unterschichtet und zentrifugiert (20 min., 400 G, 21°C, ohne Bremse). Entsprechend des Ficoll-Dichtegradienten finden sich die Granulozyten mit einigen wenigen Erythrozyten in einem Pellet im Spitzboden des Falconröhrchens, während sich die Fraktion der Mono- und Lymphozyten als Grenzschicht zwischen Plasma und Ficoll befindet. Die Mono- und Lymphozytenschicht wurde sorgfältig abpipettiert. Der restliche Überstand wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt, die Zellen dann leicht aufgeschüttelt und die in der Zellschicht verbleibenden Erythrozyten hypoosmotisch durch im Abstand von 30 Sekunden zugesetzte je 8 ml einer 0,2 % NaCl Lösung und einer 1,6 % NaCl Lösung hämolysiert. Die Zellen wurden zweimal mit Waschpuffer gewaschen (5 min./350 G/4°C) und dann in 1ml Inkubationsmedium aufgenommen. Anschließend wurden die Granulozyten in der Neubauer Kammer nach

Trypanblaufärbung gezählt und auf die gewünschte Zellzahl/ml durch Auffüllen mit Inkubationsmedium eingestellt.

Zellisolierung II:

2 ml Histopaque[®] 1077 (Sigma) wurde im Verhältnis 1:1 mit Vollblut (NH₄⁺- Heparin) von gesunden Probanden bei 37°C überschichtet. Pro Versuch wurden 6 Ansätze erstellt. Das Blut sedimentierte für 45 min., 21°C, 1g. Abhängig vom Sedimentationsergebnis erhielt man so 7.9 ml leukozytenreichen Überstand, der etwa 95-98% Granulozyten enthielt. Die Leukozyten wurden in der Neubauer Kammer nach Trypanblaufärbung gezählt und auf die gewünschte Zellzahl/ml durch Auffüllen mit Inkubationsmedium eingestellt.

Waschpuffer:

500 ml HBSS ohne Mg⁺⁺ und Ca⁺⁺
0,5g Hühnereialbumin (0,1%)

Inkubationsmedium (falls für Einzelexperimente nicht explizit anders beschrieben):

500 ml HBSS plus Mg⁺⁺ und Ca⁺⁺
0,5g Hühnereialbumin (0,1%)

2.1.2 MAKROPHAGENKULTUREN

Makrophagen wurden aus primären Monozyten differenziert.

Isolierung von Monozyten:

Von gesunden Spendern wurde mittels Leukapherese ein Leukozyten angereichertes Blutkonzentrat gewonnen ¹⁰⁶. Die mononukleären Zellen (MNC) wurden aus dem Konzentrat durch eine Dichtegradienten-Zentrifugation über Ficoll-Paque isoliert und dreimal mit PBS gewaschen. Die daran anschließende Monozytenisolierung erfolgte über eine Gegenstrom-Zentrifugation (Elutriation) (J6M –Ecentrifuge, Beckman,

München) ¹⁰⁷. Hierbei befinden sich die Zellen in einer Zentrifugationskammer, in der durch einen einstellbaren Pumpendruck entgegen der Zentrifugationskraft die Zellen nach ihrer Größe sortiert und fraktioniert werden, d.h. je größer und schwerer die Zellen, desto mehr Pumpendruck muss aufgewendet werden.

Für jedes Experiment wurden Zellen von unterschiedlichen Spendern verwandt. Die Reinheit der Zellen wurde mikroskopisch anhand ihrer Morphologie und mittels Flow Cytometrie bestimmt (Antigenexpression: CD14, CD3, CD4, CD8, CD20). Sie lag im Mittel bei etwa 90%.

In vitro Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen:

Die elutrierten Monozyten wurden in Makrophagenmedium aufgenommen und in einer Dichte von 5×10^4 /Loch in einer 96-Lochplatte (LumoxTM Multiwell 96 TC, VivascienceTM) ausgesät. Nach 4 Tagen wurde das Medium gewechselt und die Zellen an Tag 7 bzw. Tag 8 mit *M. avium* infiziert.

Makrophagenmedium:

97 ml RPMI-1640 (Sigma)	}	(Gibco, Invitrogen)
1 ml humanes AB-Serum (1%) (Sigma,)		
1 ml Sodium Pyruvat (1%)		
1 ml Aminosäuren (1%)		
100 µl β- Mercaptoethanol 5×10^{-5} M		

2.2 MYKOBAKTERIEN

2.2.1 ERSTELLEN EINER STAMMBANK VON *M. AVIUM*

Es wurden drei Umweltisolate aus heimischen Gewässern (1816, 2442, 2521) untersucht (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn PD Dr. Schulze

Röbbecke, Hygiene-Institut der Universität Bonn). Die fünf Patienten-Isolate (SCH 235, SCH 228, SCH 180, SCH 187, SCH 215) stammten sämtlich aus der Stammsammlung von Herrn Priv. Doz. Dr. Georg Plum und waren bei Routineuntersuchungen des Hygieneinstitutes der Universität Köln aus eingesandten Patientenmaterial von HIV-infizierten (SCH 235, SCH 228, SCH 187) und HIV-negativen Patienten (SCH 180, SCH 215) isoliert worden.

Das beständige Rekultivieren von *M. avium* führt zum Verlust seiner Virulenz und lange Einfrierzeiten führen zum Absterben der Bakterien. Um eine Stammbank zu erstellen, die bezüglich der Parameter Virulenz und Keimzahl eine konstante Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen Isolaten garantierte, wurden die Bakterien zunächst durch Balb C Mäuse passagiert und so mit dem murinen Immunsystem konfrontiert. Nach 6-8 Wochen wurden die Bakterien aus den Lebern und Milzen aller Mäuse am selben Tag isoliert und bei – 80° C eingefroren. In der Folge wurden für alle Isolate aus der Mauspassage alle Schritte zeitgleich durchgeführt, so dass die Zahl der Kultivierungsschritte sowie die Einfrierzeit aller Stämme gleich waren.

Mauspassage

1×10^8 Bakterien pro *M. avium* Isolat wurden je einer Balb C Maus intraperitoneal injiziert. Je zwei Mäuse wurden mit demselben Stamm infiziert. Nach 6 – 8 Wochen, wenn die Tiere deutliche Zeichen der Erkrankung zeigten (struppiges Fell, reduzierter Augenglanz), wurden sie durch Genickbruch getötet und die Leber und Milz unter sterilen Bedingungen in toto entfernt. Nachdem die Organe makroskopisch beurteilt und gewogen worden waren, wurden sie im Mörser mit feinkörnigem Quarz (Fa. Merck) zu einem gleichmäßigen Organbrei verarbeitet. Diese Passage wurde in 50 ml Aqua dest. aufgenommen, und sedimentierte für 2h bei 4°C, um Organpartikel und Mörsersand von den Bakterien zu trennen. Der Überstand der sedimentierten Passage

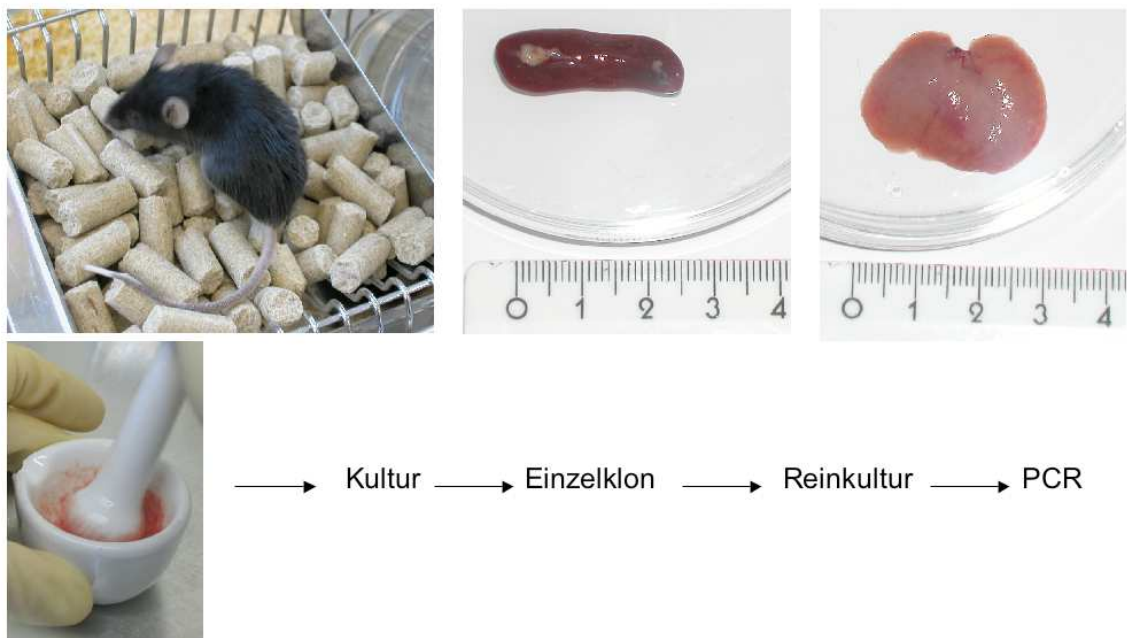
wurde bei 5000 rpm; 4°C; 10 min. zentrifugiert. Das so gewonnene Bakterienpellet wurde nach Verwerfen des Überstandes in 1ml 7H9 Brühe suspendiert. 10 µl dieser Suspension wurden abgenommen und einer Verdünnungsreihe 1:100 (v/v) zugeführt. Der Rest der Bakteriensuspension wurde aliquotiert bei –80°C eingefroren. Diese Aliquote wurden als „Mauspassage 0“ bezeichnet, da die Bakterien direkt aus den Organen isoliert und keiner weiteren Kultivierung unterzogen worden waren.

Anzüchten von *M. avium*

Von den Verdünnungen der Organpassagen (10^{-4} , 10^{-6} und 10^{-8}) wurden je 100 µl auf 7H11 Agar + PANTA ausplattiert und bei 30°C für 2-3 Wochen bebrütet. Von den gewachsenen Einzelkolonien wurden 4 Kolonien abgenommen, in je 100 µl PBS suspendiert und auf 4 7H11 Agarplatten ohne Zusätze ausgestrichen. Die Platten wurden erneut 2-3 Wochen bei 37°C bebrütet. Wenn ein dichter Bakterienrasen gewachsen war, wurden die Platten mit der Impföse abgeerntet und dabei die 4 Platten einer Spezies im Falconröhrchen in 2 ml PBS gepoolt. Die Bakteriensuspension wurde in 50 ml PBS bei 5000 rpm, 4°C, 10 min. gewaschen und das Pellet in 4 – 6 ml PBS resuspendiert. Zur Dispersion der Bakterien wurde die Suspension mit einer 10 ml Spritze durch eine 27G Nadel gepresst. 10 µl der Suspension wurden fraktioniert auf eine Blutagarplatte zur Sterilkontrolle ausgestrichen. 20 µl der Suspension wurden auf einen Objektträger für eine Ziel Neelsen Färbung zum Nachweis säurefester Stäbchen aufgebracht, die restliche Suspension wurde in 100 µl Aliquote in Kryotubes pipettiert, für 10 sek. in Stickstoff getaucht und dann bei –80° eingefroren. Ein Aliquot wurde zur Bestimmung der Keimzahl zurückgehalten. Diese Aliquote wurden als „Mauspassage 1“ bezeichnet, da die Bakterien nach Isolierung aus der Maus einen Kultivierungsprozess durchlaufen hatten. Die „Mauspassage 1“ wurde als Stocklösung für alle durchgeführten Versuche verwendet. Spätestens nach 6 Monaten Einfrierzeit der „Mauspassage 1“ wurde nach

dem oben beschriebenen Verfahren aus der „Mauspassage 0“ eine neue „Mauspassage 1“ kultiviert und die alten Aliquote verworfen. Dies geschah, um die Einflüsse der Einfrierzeit auf die Vergleichbarkeit der Ergebnisse für die verschiedenen Spezies in den Versuchen zu minimieren. Nach spätestens 12 Monaten wurde eine neue Mauspassage 0 erstellt. Für alle aus den Einzelklonen der Mauspassage 0 angereicherten Mykobakterien der Mauspassage 1 wurde eine Speziesbestimmung mittels PCR durchgeführt (Abb. 3).

Abbildung 3: Prinzip der Mauspassage



Erstellen der Agarplatten:

Middlebrook 7H11 agar (DIFCO Becton

Dickinson)

*

<i>Polymyxin B</i>	6 mg/l
<i>Azlocillin</i>	10 mg/l
<i>Nalidixinsäure</i>	20 mg/l
<i>Trimethoprim</i>	5 mg/l
<i>Amphotericin B</i>	5 mg/l

19 g Middlebrook 7H11 Agar

5 ml Glyzerin

2.5 ml 20% Tween 80

ad 900 ml Aqua dest.

Autoklavieren für 10 min.

Abkühlen auf 55°C

100 ml ADC (Albumin-Dextrose Complex) hinzufügen

PANTA* hinzufügen

in Platten ausgießen 40-45 ml / Platte

ADC: 2 g Glucose, 5 g bovines Serumalbumin der Fraktion V und 0,85 g NaCl ad 100 ml Aqua dest. mit 0,2 µm Filtern steril filtriert.

Bestimmung der Keimzahl

Unmittelbar vor dem Einfrieren und 5-7 Tage nach dem Einfrieren wurde die Keimzahl von je einem Aliquot der „Mauspassage 1“ bestimmt. Die Bakteriensuspension wurde durch eine 27 G Nadel gepresst und anschließend eine Verdünnungsreihe 1:10 (v/v) erstellt. Von den Verdünnungen 10^{-4} bis 10^{-8} wurden zur Bestimmung der Koloniebildenden Einheiten (*Colony forming Units* = CFU) 4 x 20 µl auf eine in 4 Quadranten unterteilte 7H11 Middlebrook Agarplatten nach der Methode von Crowle et al. getropft¹⁰⁸. Die Platten wurden bis zur sichtbaren Differenzierung von Einzelkolonien bei 37°C bebrütet. Die Einzelkolonien in den 4 Quadranten der Agarplatte wurden für 2-3 Verdünnungsstufen gezählt und der Mittelwert pro Platte gebildet. Die Bestimmung wurde nur dann verwertet, wenn die Abweichung der 4 Werte einer Platte voneinander < 10% war, und wenn die Keimzahl auf den Platten exponentiell entsprechend der Ausgangsverdünnungen abnahm. Aus dem Mittelwert der CFU wurde so unter Einbeziehung des Ausgangsvolumens und der Verdünnungsstufe die CFU/ml für jeden Stamm der „Mauspassage 1“ bestimmt. Das Schockgefrieren der Aliquote wurde nur dann als erfolgreich gewertet, wenn zwischen der CFU vor dem Einfrieren und nach dem Einfrieren ein Unterschied von < 10% ermittelt wurde. Die ermittelte CFU nach dem Einfrieren stellte die Grundlage für die Einstellung der Bakterienkonzentration in den einzelnen Experimenten dar.

Berechnungsformel der CFU /ml

$$\text{CFU/ml} = X \times 1/10^y \times 1/V \text{ (ml)}$$

X = Ausgezählte Menge der CFU in verdünnter Ausplattierung, y = Exponent der Verdünnungsstufe der gezählten Ausplattierung V = Tropfenvolumen

2.2.2 ANREICHERUNG UND SEQUENZIERUNG DER ISOLATE MIT PCR

Um die Spezies der Isolate nach der Mauspassage zu bestimmen bzw. erneut zu bestätigen, wurde die ribosomale DNA (rDNA) der Isolate zunächst amplifiziert und dann sequenziert. Die Differenzierung der Isolate erfolgte dann in der RIDOM Datenbank (*Ribosomal Differentiation of Medical Micro-organisms*) der Universität Münster.

Eine Einzelkolonie von *M. avium* wurde in aqua dest. suspendiert und diese *Template* Lösung in einer ersten PCR amplifiziert. Da *M. avium* und *M. intracellulare* bezüglich ihrer 16s rDNA identisch sind, sich aber in der ITS (*internal transcribed spacer*)-Sequenz unterscheiden, wurden folgende ITS-Primer verwendet:

16s-1511f (E. coli: 1492-1511 16s rDNA) 5'-AAG TCG TAA CAA ARC CG-3' ITS-fwd

23s-23r (E. coli: 39-23 23s rDNA) 5'-YYG CCA AGG CAT CCA CC-3' ITS-rev

1. PCR zur Anreicherung

Reaktionsansatz in einem Volumen von 50 µl

Template-Lösung	10 µl
PCR Puffer, 10x konz. w/o Mg ⁺⁺ /Cl ⁺ (Roche)	5 µl
MgCl ₂ , 25 mmol (Roche)	4µl
Primer ITS_fwd	1 µl
Primer ITS_rev	1 µl
PCR Nucleotid Mix , 10 mM (Roche)	1 µl
Taq-Polymerase (Hot Star, Qiagen, 5U/µl)	0,3 µl
Wasser	27,7 µl

Nach einem Denaturierungsschritt von 15 min. bei 95°C wurden üblicherweise 30 Zyklen des nachfolgenden Reaktions-Schemas angewandt:

Denaturierung	1 min	94°C
Primerannealing	1 min	50°C
Elongation	2 min	72°C

Die finale Elongation erfolgte schließlich für 20 min. bei 72°C.

Anschließend wurden die amplifizierten PCR Fragmente mit einem PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt und in 50 µl Wasser eluiert.

Das Eluat wurde schließlich sequenziert.

2. Sequenzierungs-PCR

Reaktionsansatz in einem Volumen von 20 µl

Eluat von PCR 1		3 µl
Sequenzier -Puffer, 5x konz. (Applied Biosystems)		4 µl
BigDyeTerminator 1.1 (Applied Biosystems)		2 µl
Primer ITS_fwd oder Primer ITS_rev		1 µl
Wasser		10 µl

Die Sequenzierung erfolgte in 5 Zyklen des folgenden Reaktionsschemas

Denaturierung	10 sec	96°C
Primerannealing	5 sec	50°C
Elongation	4 min	60°C

Anschließend wurde die DNA über DyeExSpin (Qiagen) entsprechend der Angaben des Herstellers gereinigt und im automatischen Sequenziergerät (Sequencer von Applied Biosystems: ABI PRISM 310 Genetic Analyzer) analysiert.

2.2.3 BESTIMMUNG DER VIRULENZ DER ISOLATE

Die Virulenzunterschiede der einzelnen Stämme wurden anhand der Wachstumskurven und der daraus ermittelten mittleren Generationszeiten der *M. avium*-Stämme in humanen Makrophagen definiert.

Infektion und Phagozytose

Makrophagen wurden wie unter 2.1.2 beschrieben aus elutrierten humanen Monozyten differenziert und am Tag 8 mit einer *Multiplicity of Infection (MOI)* = Verhältnis von Makrophagen zu Bakterien von 1:10 infiziert. Pro Bakterienstamm und Messzeitpunkt wurden vier, bei vier Messzeitpunkten also pro Stamm jeweils 16 Löcher der 96-Lochplatte infiziert. Nach einer Bebrütung von 2 Stunden bei 37°C/ 5% CO₂ wurde das Infektionsmedium entfernt, extrazelluläre Bakterien in 3 Waschgängen mit warmem RPMI entfernt und die Kulturen in Makrophagenmedium mit einem reduzierten Zusatz von humanen AB-Serum auf 1% bis zu einer Woche weiter bebrütet. Der niedrige Serumanteil am Nährmedium diente neben regelmäßigen Mediumwechseln dazu, extrazelluläres Bakterienwachstum auf ein Minimum zu reduzieren.

Quantifizierung des intrazellulären Bakterienwachstums

Zu definierten Zeitpunkten, zwei Stunden nach Infektion, Tag drei, fünf und sieben, wurde das Nährmedium aus jeweils vier Kulturgefäßen für jeden Stamm entfernt und die Zellen noch einmal mit warmem RPMI gewaschen. Anschließend wurden die Makrophagen durch den Zusatz von 100 µl Sodium Dodecyl Sulfat (SDS 0,1%) lysiert. SDS 0,1% wurde zum Schutz der freigesetzten Bakterien nach 10 Minuten mit 100 µl bovinen Serumalbumin (BSA 20%) neutralisiert. Alle Lysate wurden in Eppendorfhütchen überführt, für 5 Minuten im Ultraschallbad bei 100 Watt dispergiert und daraufhin in seriellen Schritten 1:10 (v/v) in 7H9 broth verdünnt. Vier 20 µl Tropfen wurden, wie bei Crowle¹⁰⁸ beschrieben auf gut vorgetrocknete Middlebrook Agarplatten gegeben und 10 Tage bei 37°C bebrütet. Die gewachsenen Kolonien

wurden unter dem Inversionsmikroskop ausgezählt, die CFU pro ml Zelllysate (CFU/ml) nach der unter 2.2.1 genannten Formel ermittelt und halblogarithmisch gegen die Zeit in Tagen aufgetragen. Aus dem Steigungsgrad der so ermittelten Wachstumskurven wurde die Virulenz der untersuchten Bakterienstämme definiert. Für einen direkten Virulenzvergleich wurde die mittlere Generationszeit der phagozytierten Mykobakterien als die Zeit, die für eine Verdoppelung der bakteriellen Population benötigt wurde berechnet. Mit Hilfe der Regressionsgraden der Messpunkte zwischen den Tagen null und fünf (bzw. den Stunden 2 und 120) ließ sich auf der Abszisse die Stundenzahl ablesen, die einer Verdopplung der Bakterienzahl, also einer Steigerung von 0,3 auf der logarithmisch skalierten Ordinate entsprach.

2.3 INTRAZELLULÄRE ABTÖTUNG

Neutrophile Granulozyten wurden wie beschrieben isoliert (2.1.1 Zellisolierung II). Stocklösungen der Mauspassage 1 wurden aufgetaut, im Ultraschallbad dispergiert und verbleibende Aggregate durch eine *low-speed* Zentrifugation (300 g, 10 min.) entfernt. In 1000 ml HBSS/Hepes, pH 7,4 wurden Granulozyten ($2,5 \times 10^6$ / ml) und *M. avium* ($2,5 \times 10^7$ / ml) entsprechend einer MOI von 1:10 für definierte Intervalle (15 min. bis max. 3 h) bei 37°C inkubiert. Eine Negativkontrolle wurde für die maximale Inkubationszeit bei 4°C gehalten. Granulozyten und freie Bakterien wurden durch eine weitere *low-speed* Zentrifugation voneinander getrennt, der Überstand mit den freien Bakterien abgenommen und die Granulozyten in 1 ml SDS 0,1 % resuspendiert und lysiert. Sowohl die Lysate, als auch die Überstände wurden seriell 1:10 (v/v) verdünnt und zur Keimzahlbestimmung wie unter 2.2.1 beschrieben auf Middlebrook 7H11 Agar getropft. Nach ein bis zwei Wochen wurden die CFUs gezählt und die Killingaktivität berechnet. Basierend auf den Beobachtungen aus Vorarbeiten, die gezeigt haben, dass die maximale Aufnahme von Bakterien bereits nach 15 min. erreicht ist¹⁰⁰, wurde

die aus den Lysaten nach einer Inkubationszeit von 15 min. bestimmte Keimzahl = 100 % gesetzt. Dementsprechend wurde für die Lysate der folgenden längeren Inkubationszeiten der Killingindex (KI) in Prozent der CFU bei 15 min. berechnet:

$$KI = [CFU_{(15 \text{ min.})} - CFU_{(x \text{ min.})}] \times 100 / CFU_{(15 \text{ min.})}$$

Für jeden Messzeitpunkt wurden 4 unabhängige Proben (Quadriplets) angelegt.

2.4 ELISA (ENZYME LINKED IMMUNO-SORBENT ASSAY)

Die Induktion der Zytokine MCP-1, TNF- α , IL-8, Gro- α , MIP-1 α , MIG/CHCL9, TGF- β , IL-1 β und IL-1ra wurde in den Überständen der mit *M. avium* infizierten Granulozyten bzw. THP-1 Zellen mit kommerziellen ELISA-Kits (R & D Systems) nachgewiesen.

2.5 IMMUNFLUORESCENZ

Die phagosomale Prozessierung von grünfluoreszenten *M. avium* Isolaten in neutrophilen Granulozyten wurde mittels einer roten Immunfluoreszenzfärbung charakteristischer Marker der frühen endosomalen und späten lysosomalen Vakuolen visualisiert. Aufgrund der Tatsache, dass sich in der praktischen Anwendung, Fluoreszeinthiocyanat (FITC) als der bessere Farbstoff für die Doppelfluoreszenzdarstellung erwiesen hatte, wurde FITC anstatt Auramine-O verwandt und die Möglichkeit einer Opsonisierung in Kauf genommen.

Fluoreszenzfärbung von *M. avium*

200- 300 μ l Bakteriensuspension eines *M. avium* Isolates der Mauspassage 1 wurden auf 1 ml mit PBS aufgefüllt und in der Minifuge gewaschen (15000 rpm, 1min.). Nach Verwurf des Überstandes wurden die Bakterien in 180 μ l NaHCO₃ (0.1 m) Puffer resuspendiert, 20 μ l Fluoreszeinthiocyanat (FITC Stocklösung 100 μ g/ml = 0,25 M) zugesetzt und lichtgeschützt bei 37°C inkubiert. Na ch dreimaligem Waschen in PBS

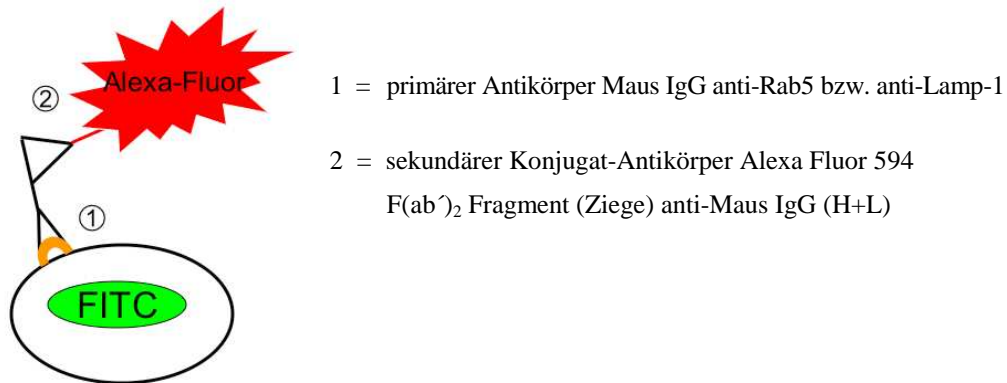
wurden die Bakterien 1000 µl PBS (0.1 % Hühnereialbumin) resuspendiert und zur Dispersion durch eine 27G Kanüle passiert.

Infektion von neutrophilen Granulozyten

Granulozyten wurden wie unter 2.1.1 beschrieben isoliert (Zellisolierung I) und mit FITC gefärbten *M. avium* mit einer MOI von 1:10 bei 37°C im Thermoblock auf niedrigster Schüttelstufe (500 rpm) in 200 µl PBS (0.1 % Hühnereialbumin) infiziert. Zu definierten Zeitpunkten (20 und 60 min.) wurden die Ansätze auf Eis (4°C) gestoppt und extrazelluläre Bakterien durch eine *low speed* Zentrifugation (300 g, 10 min.) entfernt. Die Granulozyten wurden in 200 µl PBS resuspendiert und je ein großflächiger Tropfen von geringem Volumen sowie ein kleinerer Tropfen von ca. 5 µl auf einen Objektträger aufgebracht. Die Präparate wurden lichtgeschützt bei Raumtemperatur getrocknet, anschließend mit Paraformaldehyd 4% für 10 min. fixiert und in PBS (5% FCS) gewaschen. Nach vollständiger Abtrocknung der Präparate, wurden die Tropfen mit einem „DakoCytomation Pen“ umrandet und so eine hydrophobe Barriere geschaffen, die eine lokale Applikation von Flüssigkeiten auf die Objektträger erlaubt und durch ihre fluoreszierenden Eigenschaften im Fluoreszenzmikroskop leicht zu erkennen ist. Innerhalb der Dakobarriere wurden die Zellen für 10 min. mit Triton X 100 0,5% permeabilisiert und erneut in PBS (5% FCS) gewaschen. Die Präparate wurden mit einem spezifischen anti-Rab5 bzw. anti-Lamp-1 Mausantikörper für 60 min. bei Raumtemperatur inkubiert (Abb. 4 ①), erneut gewaschen und mit einem Alexa Fluor konjugierten anti-Maus IgG F(ab')₂ Fragment für 45 min. inkubiert (Abb. 4 ②). Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Präparate mit einem Feuchtdeckmittel (Gel/Mount) benetzt und mit einem Deckglas versehen.

Abbildung 4

Schematische Darstellung der Doppelimmunfluoreszenzfärbung



FITC markierte *M. avium* Bakterien fluoreszieren grün, die phagosomalen Marker rot.

Bei einer Kolo-kalisation von Bakterium und Vakuole, stellen sich die intraphagosomalen Bakterien durch die Überlappung der Fluoreszenzen gelb dar.

Verwendete Antikörper

Antikörper (Konjugat)	Klon / Isotyp	Konzentration	Bezugsquelle
Anti-Rab5	15, Maus IgG1	1µg/ml	BD Biosciences Pharmingen
Anti-Lamp-1	25, Maus IgG2b	2µg/ml	BD Biosciences Pharmingen
Anti-Maus IgG (Alexa Fluor)	Alexa Fluor 594 F(ab') ₂ Fragment (Ziege) anti-Maus IgG (H+L)		Molecular Probes

Fluoreszenzmikroskopie

Die Präparate wurden mit einem Olympus IX81S1F Fluoreszenzmikroskop mit verschiedenen Filtereinsätzen beurteilt: Filter U-MNIBA2 für FITC (Excitation 470-490 nm, Emission 510-550 nm); Filter U-MWG2 für Alexa-Fluor (Excitation 510-550 nm, Emission 590 nm LP). In der Fluoreszenzmikroskopie wurden ausschließlich solche Zellen in die Beurteilung mit einbezogen, in denen sich Bakterien auf Einzelzellniveau fanden. Zellen mit Bakterienklumpen wurden von der Beurteilung ausgenommen.

2.6 SPENDERKOLLEKTIV

Die Granulozyten wurden aus Vollblut von 8 weiblichen und 14 männlichen gesunden Probanden im Alter zwischen 24 und 52 Jahren gewonnen. Die durchschnittliche Leukozytenzahl betrug $7869 \pm 2127/\mu\text{l}$.

2.7 STATISTIK

Die statistische Signifikanz der Wachstumsgeschwindigkeit von *M. avium* in humanen Makrophagen mit dem Student's t Test berechnet. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet. Die CFU-Werte bzw. der Killing-Index sowie die Zytokininduktion für neutrophile Granulozyten wurden in einer Varianzanalyse auf ihre statistische Signifikanz untersucht (SPSS 11.0, Chicago, IL). Post hoc Paarvergleiche wurden mit dem Scheffes Test durchgeführt.

3 RESULTATE

3.1 SEQUENZIERUNG DER ISOLATE MIT PCR

Für die Mauspassage wurden ausschließlich Isolate der Spezies *M. avium* eingesetzt. Die Sequenzierung der Isolate nach der Mauspassage ergab für alle Isolate die Spezies *M. avium*, wobei für drei Isolate die Subspezies (ssp.) *paratuberculosis* identifiziert werden konnte. Alle anderen Isolate wurden taxonomisch als *M. avium* ssp. *avium* eingeordnet (Tab. 1).

3.2 BESTIMMUNG DER VIRULENZ DER ISOLATE

Die Virulenz der einzelnen Stämme wurde wie in 2.2.3 beschrieben anhand der Wachstumskurven und der daraus ermittelten Generationszeiten der *M. avium* Stämme in humanen Makrophagen definiert. Die Stämme, die für die Untersuchungen bezüglich des Einflusses der Virulenz von *M. avium* auf verschiedene Kapazitäten der neutrophilen Granulozyten eingesetzt wurden, sind in Tabelle 1 gelistet.

Tabelle 1: Mittlere Generationszeit von AIDS-Isolaten und Umweltstämmen

Stamm	Herkunft	Spezies	Mittlere Generationszeit (h ± SD)
SCH 235	Blut; AIDS; DI	<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>	16 ± 2,0
		<i>M. avium</i>	
SCH 228	KM; AIDS; DI	ssp. <i>paratuberculosis</i>	18 ± 3,6
		<i>M. avium</i>	
2521	Wasser	ssp. <i>paratuberculosis</i>	19±2,4
1816	Wasser	<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>	23 ± 3,0
SCH 180	BAL	<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>	36 ± 8,8
SCH 187	EDTA-KM; AIDS; DI	<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>	36 ± 9,5
SCH 215	LK, Lymphadenitis colli	<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>	76 ± 16,5
		<i>M. avium</i>	
2442	Wasser	ssp. <i>paratuberculosis</i>	84 ± 26

Stammbezeichnung, Quelle und Generationszeit der getesteten Stämme. LK = Lymphknoten,

BAL = Bronchoalveoläre Lavage, KM = Knochenmark, DI = Disseminierte Infektion.

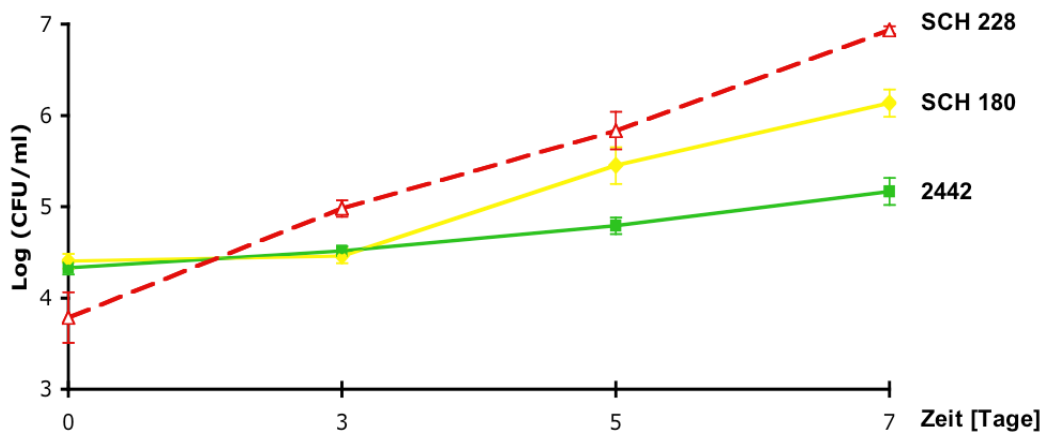
Bezüglich ihrer Herkunft ließen sich die Stämme in drei Gruppen einteilen, A: AIDS-Isolate, die bei HIV-infizierten Patienten eine disseminierte Infektion verursacht hatten (n=3); B: Isolate von HIV-negativen Personen (n=2). Bei diesen handelte es sich, entsprechend der klinischen Daten, um ein Isolat aus der BAL ohne klinische Relevanz und um ein Isolat aus dem Lymphknoten eines Kindes mit zervikaler Lymphadenitis, somit einem klinisch bedeutsamen Keim; C: Umweltstämmen aus heimischen Gewässern.

Für die untersuchten Stämme ließ sich keine Korrelation der mittleren Generationszeit im Makrophagenmodell und der Herkunft bzw. der klinischen Relevanz der *M. avium* Isolate nachweisen. Die Wachstumsgeschwindigkeit korrelierte auch nicht mit der Subspezies der Isolate.

Die Signifikanz des unterschiedlichen Wachstumsverhaltens der einzelnen Stämme wurde für die Zeitpunkte Tag 3 und Tag 5 bestimmt, da die Makrophagenkulturen am Tag 7 teilweise bereits Schwankungen bezüglich der Zellvitalität aufwiesen. Insgesamt zeigten die AIDS-isolate ein sehr homogenes Wachstumsverhalten. Die beiden schnell wachsenden Umweltstämme 2521 und 1816 unterschieden sich in ihrer Virulenz nicht von den AIDS-Isolaten ($p=0,17$ für Tag 3; $p=0,35$ für Tag 5). Hingegen wuchsen das klinische Isolat SCH 215 und das Umwelt-Isolat 2442 signifikant langsamer als die AIDS-Stämme ($p=0,006$ für Tag 3 und $p=0,007$ für Tag 5) (Abb. 5).

Abbildung 5

Intrazelluläre Wachstumsraten



Wachstumsraten von drei ausgewählten Beispielen der *M. avium* Isolate. Makrophagenkulturen wurden mit den Stämmen bei einer MOI von 1:10 infiziert. Zu definierten Zeitpunkten wurden die Überstände abgenommen, die Makrophagen lysiert und die Lysate in serieller Verdünnung auf 7H11 Agar ausplattiert, um so die CFUs der freigesetzten Bakterien zu bestimmen. Die angegebenen Messpunkte repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier unabhängigen Experimenten. Das AIDS-Isolat SCH 228 zeigt die höchste Wachstumsrate, das klinische Isolat eines HIV-negativen Patienten, SCH 180, zeigt eine etwas geringere Wachstumsrate, während das Umweltisolat 2442 eine signifikant geringere Wachstumsgeschwindigkeit als das AIDS-Isolat aufweist.

Dementsprechend wurden die Stämme SCH 215 und 2442 als niedrig virulent eingestuft und alle anderen Stämme als hochvirulent.

3.3 EINFLUSS DER VIRULENZ AUF DIE INTRAZELLULÄRE ABTÖTUNG VON *M. AVIUM* DURCH NEUTROPHILE GRANULOZYTEN

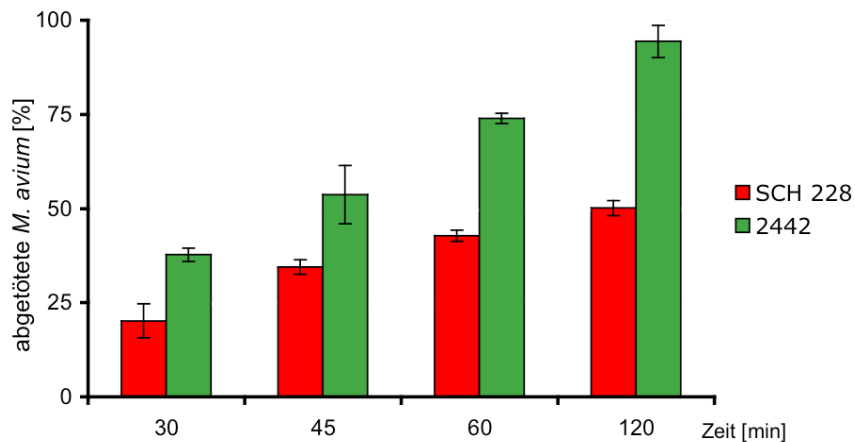
Aufgrund der begrenzten Ausbeute an Neutrophilen, die pro Einzelspender zu erzielen war, und der geforderten Mehrfachbestimmungen, die nötig waren, um die Validität der Experimente zu gewährleisten, war in diesen Untersuchungen pro Experiment immer nur der Vergleich von 2 Stämmen möglich. In allen durchgeführten Experimenten mit verschiedenen Spendern wurden die hochvirulenten Stämme signifikant schlechter intrazellulär abgetötet als die niedrig virulenten Stämme ($p=0,001$). Auch zeigten sich in den vergleichenden Untersuchungen der hochvirulenten Stämme graduelle Unterschiede bezüglich der Effektivität der intrazellulären Abtötung, die für einige Spender mit der Virulenz der Isolate korrelierte. Allerdings zeigten sich die Ergebnisse der einzelnen Spender bezüglich ihrer Signifikanz als sehr inhomogen. Die initiale Phagozytoseleistung der Neutrophilen, die durch die CFUs der Lysate 15 Minuten nach Infektion ermittelt wurde, war unabhängig von der Virulenz der *M. avium* Stämme.

Abbildung 6 zeigt die vergleichende Untersuchung für die intrazelluläre Abtötung zwischen dem AIDS-Isolat SCH 228 und dem Umwelt-Isolat 2442. Während der Stamm 2442 nach 120 Minuten zu fast 100% abgetötet ist, ist zu diesem Zeitpunkt nur etwa die Hälfte des initial phagozytierten Stammes SCH 228 abgetötet. Bei einer längeren Gesamtdauer des Experimentes ändert sich der Killing Index für Lysate, die zu späteren Zeitpunkten gewonnen wurden nicht, was impliziert, dass die Kapazität neutrophiler Granulozyten, hochvirulente *M. avium* Stämme abzutöten, limitiert ist.

Abbildung 6

Killingindex für die intrazelluläre Abtötung der Isolate

SCH 228 und 2442 durch neutrophile Granulozyten



Das hochvirulente AIDS-Isolat (SCH 228) wird signifikant schlechter abgetötet als das niedrig virulente Umwelt-Isolat (2442). Neutrophile Granulozyten wurden bei einer MOI von 1:10 infiziert. Zu definierten Zeitpunkten wurden freie Mykobakterien nach einer niedrigtourigen Zentrifugation im Überstand entfernt, die Granulozyten lysiert und die Lysate in serieller Verdünnung auf 7H11 Agar ausplattiert, um so die CFUs der freigesetzten Bakterien zu bestimmen. Die angegebenen Messpunkte repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier unabhängigen Experimenten.

3.4 ZYTKININDUKTION DURCH *M. AVIUM* UNTERSCHIEDLICHER VIRULENZ IN NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN

Die Konzentration der Zytokine TNF- α , TGF- β , IL-8, Gro- α , MIP-1 α , MIG, MCP-1, IL-1 β und IL-1-ra wurde in den Überständen der mit *M. avium* infizierten neutrophilen Granulozyten zu definierten Zeitpunkten post infectionem mit kommerziellen ELISA-Kits (R & D Systems) gemessen. MCP-1, Gro- α , MIG, TNF- α und TGF- β ließen sich lediglich in Konzentrationen von < 40 pg/ml in den Granulozytenüberständen nachweisen und zeigten keine Unterschiede in der Konzentration für *M. avium* Isolate mit hoher Virulenz gegenüber Isolaten mit niedriger Virulenz. Abhängig vom Granulozytenspender zeigten die Konzentrationen der Zytokine im Überstand eine

hohe Variabilität für alle *M. avium* Isolate. Unabhängig vom Granulozytenspender jedoch war die Konzentration einiger Zytokine im Überstand abhängig von der Virulenz der *M. avium* Isolate. IL-8 und MIP-1 α wurden in den Überständen der mit niedrig virulenten Isolaten infizierten Neutrophilen in signifikant höheren Konzentrationen nachgewiesen ($p=0,004$), als in den Überständen der mit hochvirulenten Isolaten infizierten Neutrophilen (Abb. 7A und 8). Tabelle 2 fasst die Ergebnisse der Abbildungen 7 bis 10 zusammen. Hier wird die Abhängigkeit der Quantität der induzierten Zytokine vom jeweiligen Granulozytenspender besonders deutlich.

Tabelle 2

IL-8 Konzentration in Überständen von mit *M. avium* infizierten Granulozyten

Sponder Nr.	Stamm	Virulenz	Zytokin	Konzentration 8 Std. p.i.
1	SCH 215	niedrig	IL-8	529,60 \pm 29,7
1	SCH 180	hoch	IL-8	303,65 \pm 52,95
2	SCH180	hoch	IL-8	1868,50 \pm 152,50
2	2521	hoch	IL-8	1688,00 \pm 246,00
3	2442	niedrig	MIP-1 α	173,25 \pm 7,75
3	SCH 235	hoch	MIP-1 α	103,36 \pm 5,36
4	2442	niedrig	IL-1 β	6946,00 \pm 390,00
4	SCH 235	hoch	IL-1 β	7108,00 \pm 350,00
5	SCH 235	hoch	Il-1ra	3730,50 \pm 134,50
5	SCH 215	niedrig	Il-1ra	2278,00 \pm 11,00
6	SCH 235	hoch	Il-1ra	7562,32 \pm 198,25
6	SCH 228	hoch	Il-1ra	7365,87 \pm 259,49

Abbildung 7

IL-8 Konzentration in Überständen neutrophiler Granulozyten

nach Infektion mit *M. avium* Isolaten unterschiedlicher Virulenz

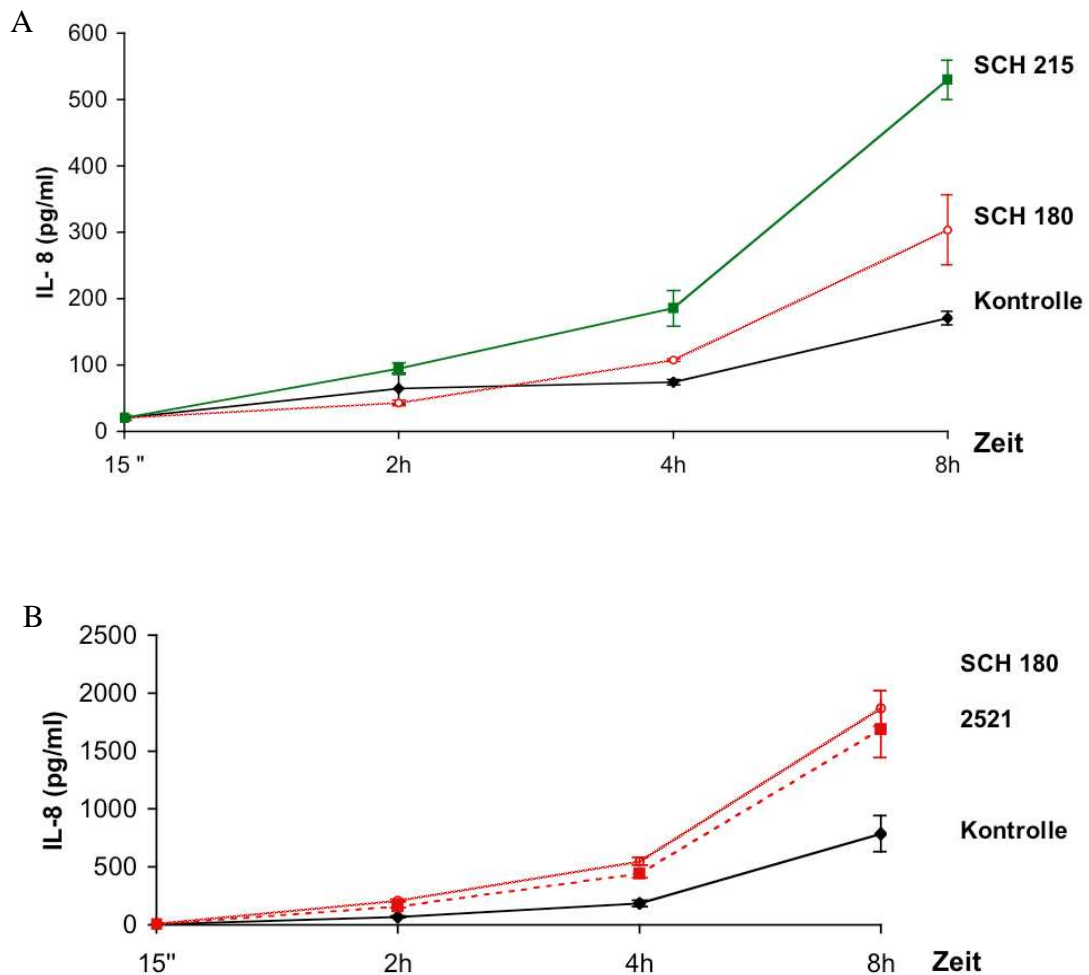


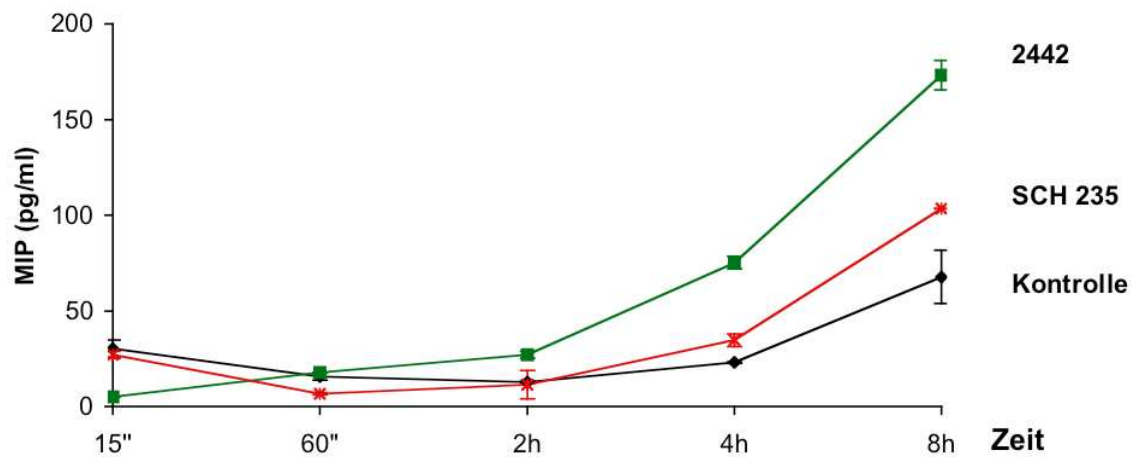
Abb. 7—10:

Die Graphiken zeigen jeweils eine Versuchsreihe eines individuellen Spenders. Dabei wurden jeweils unterschiedliche Stämme aus der Gruppe der hochvirulenten Isolate (rot) mit solchen aus der Gruppe der niedrig virulenten Isolate (grün) verglichen. Die einzelnen Messpunkte stellen Mittelwert und Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten dar. Niedrig virulente Isolate induzierten signifikant mehr IL-8 und MIP-1 α als hochvirulente Isolate ($p=0,001$) hingegen verhält es sich für IL-1 α genau umgekehrt (7A; 8; 10A). Die Konzentration von IL-1 β in den Neutrophilen-Überständen war unabhängig von der Virulenz der *M. avium* Isolate (9). Überstände von Neutrophilen nach Infektion mit Isolaten gleicher Virulenz zeigten keinen Unterschied in der Konzentration der Zytokine (7B; 10B).

Abbildung 8

MIP-1 α Konzentration in Überständen neutrophiler Granulozyten

nach Infektion mit *M. avium* Isolaten unterschiedlicher Virulenz

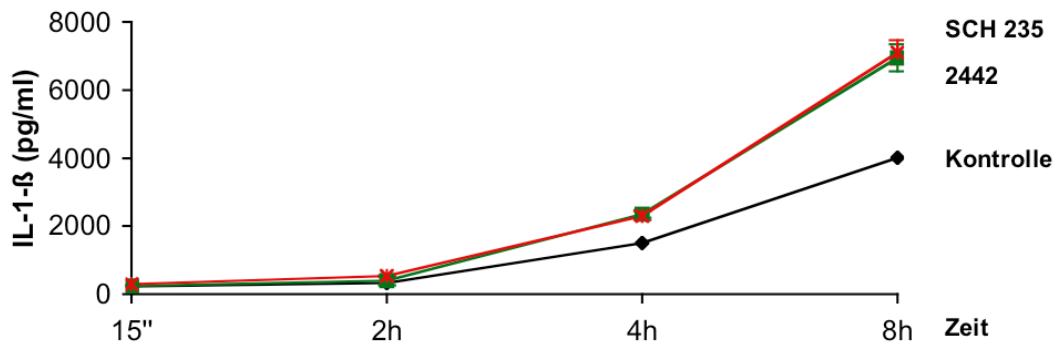


IL-1- β wurde ließ sich in den Überständen von *M. avium* infizierten Neutrophilen aller Spender in hohen Konzentrationen nachweisen, allerdings war die Induktion von IL-1 β unabhängig von der Virulenz der Isolate.

Abbildung 9

IL-1 β Konzentration in Überständen neutrophiler Granulozyten

nach Infektion mit *M. avium* Isolaten unterschiedlicher Virulenz



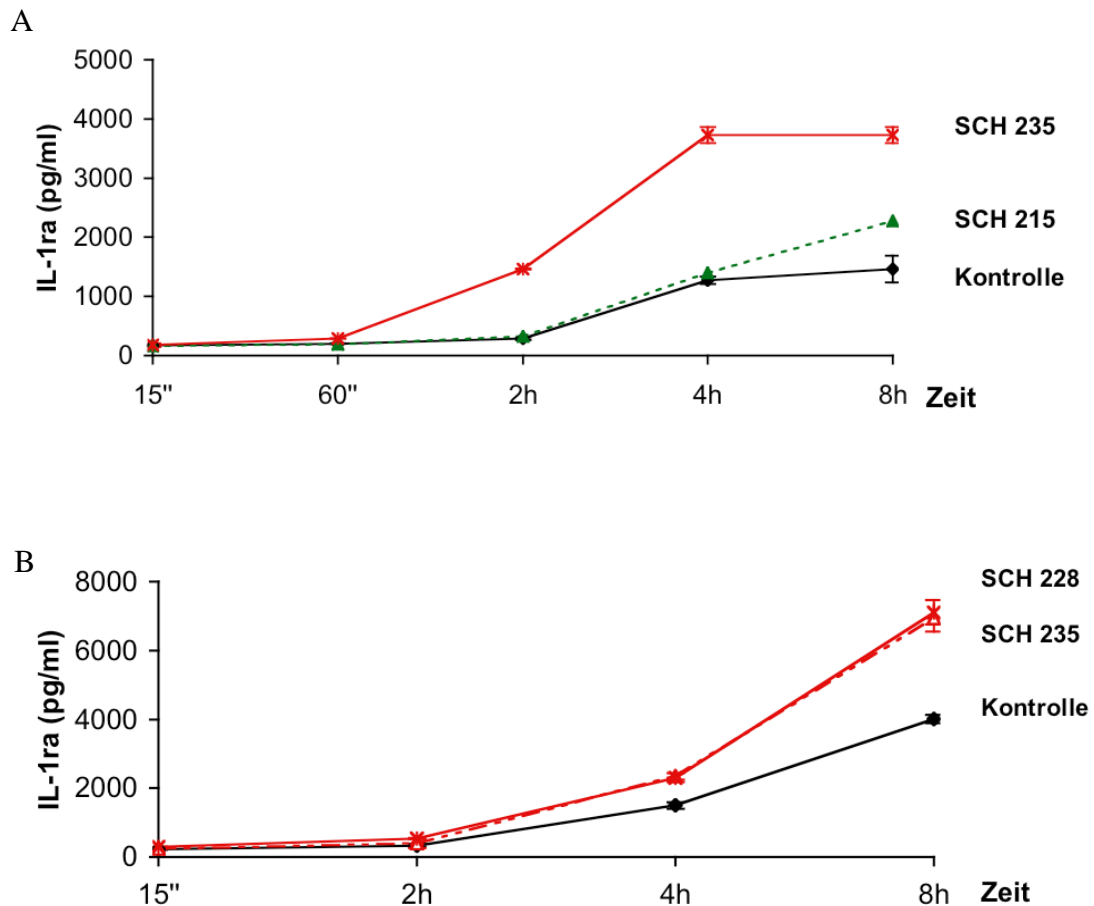
Der Rezeptorantagonist von IL-1, IL-1ra, wurde hingegen virulenzabhängig sezerniert und zwar in signifikant höheren Konzentrationen durch die hochvirulenten Isolate im Vergleich mit den niedrig virulenten Isolaten (Abb. 10)

Im Vergleich von Isolaten gleicher Virulenz ließ sich reproduzierbar kein signifikanter Unterschied in der Konzentration der Zytokine im Überstand der Neutrophilen ausmachen. Dies ist beispielhaft gezeigt für IL-8 und IL1ra (Abb.7B und 10B)

Abbildung 10

IL-1ra Konzentration in Überständen neutrophiler Granulozyten

nach Infektion mit *M. avium* Isolaten unterschiedlicher Virulenz



3.5 EINFLUSS DER VIRULENZ VON *M. AVIUM* AUF DIE PHAGOSOMENREIFUNG VON NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN

Für vier der *M. avium* Isolate (SCH 235, SCH 228, SCH 215 und 2442) wurde parallel zu den Killing-Experimenten die phagosomale Prozessierung der Mykobakterien untersucht. Abhängig von der Granulozytenausbeute der einzelnen Spender wurden in dieser Reihe von Experimenten jeweils zwei bzw. drei Stämme miteinander verglichen. Die Neutrophilen wurden 20 Minuten bzw. 60 Minuten post infectionem (p.i.) permeabilisiert und für die endosomalen bzw. lysosomalen Marker Rab5 und LAMP-1

fluoreszenz-markiert (siehe Material und Methoden). In der 400-fachen Vergrößerung wurden jeweils 50 mikroskopische Felder nach Zell-assoziierten Einzelbakterien durchgemustert, die dann in der 1000-fachen Vergrößerung bezüglich ihrer möglichen Kolokalisation mit der phagosomalen Vakuole beurteilt wurden. Die Kolokalisation von phagosomaler Vakuole und *M. avium* wurde durch die Überlappung der Fluoreszenzen der Alexa-Fluor markierten Vakuole (rot) und des FITC-gefärbten Bakteriums (grün) angezeigt, die den Komplex von Phagosom und *M. avium* gelb erscheinen ließ (Abb. 11). Intraphagosomale Bakterien wurden in Prozent aller sichtbaren Zell-assoziierten Einzelbakterien erfasst. Nach 20 und 60 Minuten zeigte sich für alle untersuchten Stämme eine Kolokalisation der FITC gefärbten Bakterien mit den Phagosomen, die Rab5 markiert waren. Dabei fanden sich zum Zeitpunkt 20 Minuten p.i. mehr Bakterien in Rab5 assoziierten Phagosomen als 60 Minuten p.i. für die niedrig virulenten Stämme SCH 215 und 2442, wohingegen für die hoch virulenten Stämme SCH 235 und SCH 228 die Verteilung der Bakterien in Rab5 assoziierten Phagosomen für beide Messzeitpunkte nahezu gleich war. Die Stämme SCH 215 und 2442 zeigten nach 20 und 60 Minuten eine Kolokalisation der FITC markierten Bakterien mit dem phagolysosomalen Marker LAMP-1, wobei die Kolokalisation häufiger in den Präparaten für den Zeitpunkt 60 Minuten p.i. beobachtet wurde. Im Gegensatz dazu fanden sich für die hochvirulenten Stämme kaum Kolokalisationen von Bakterien und Lysosomen. Diese quantitative Verteilung der erfassten Kolokalisationen von *M. avium* mit den unterschiedlichen Entwicklungsstadien der phagosomalen Vakuole impliziert, dass die niedrig virulenten Stämme SCH 215 und 2442 vom frühen Phagosom/Endosom in das reife Phagolysosom prozessiert werden, wohingegen die vollständige Ausreifung der phagosomalen Vakuole, die hoch virulente Mykobakterien enthält, nur partiell stattfindet. Die Verteilung der erfassten Kolokalisationen von Bakterien und phagosomalen Vakuolen zu den verschiedenen Zeitpunkten ist in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3

Prozentuale Verteilung Neutrophilen-assoziiierter *M. avium* unterschiedlicher

Virulenz in frühen bzw. späten Phagosomen

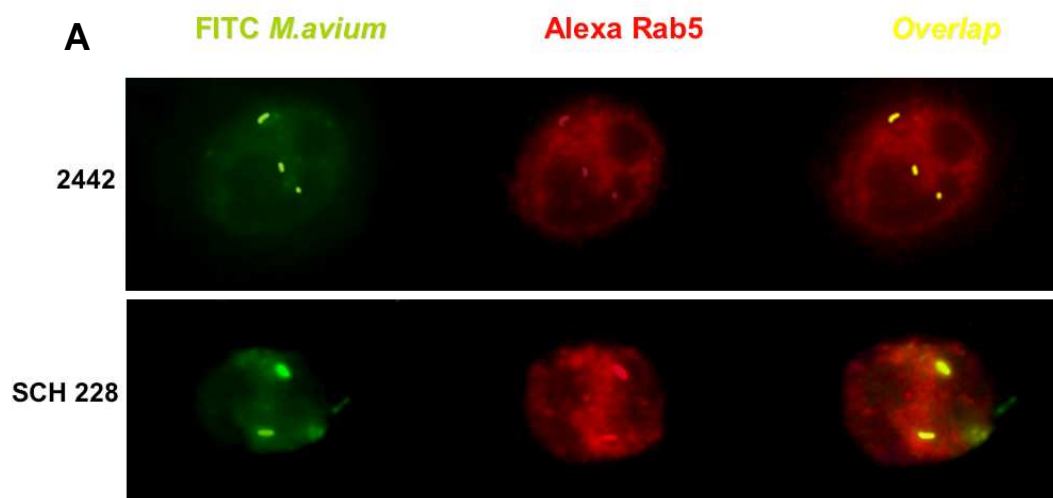
Marker	<i>M. avium</i> Stamm				Zeit min
	SCH 235	SCH 228	SCH 215	2442	
rab5	73,9 ± 12,6	67,9 ± 10,8	79,1 ± 12,3	67,7 ± 13,4	20
LAMP-1	6,8 ± 5,1	7,3 ± 5,5	38,0 ± 7,9	42,6 ± 9,2	20
rab5	78,96 ± 10,7	82,7 ± 12,3	42,5 ± 8,5	35,8 ± 7,5	60
LAMP-1	27 ± 6,3	26 ± 9,1	83,8 ± 12,9	78,5 ± 8,0	60

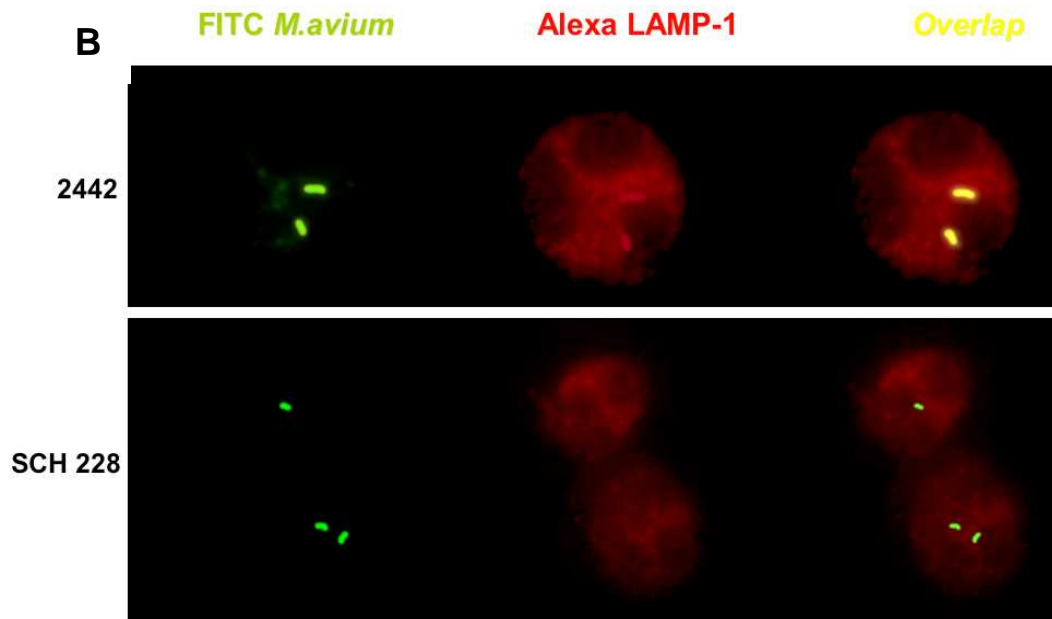
Neutrophile wurden bei einer MOI von 1:10 mit *M. avium* Stämmen unterschiedlicher Virulenz infiziert und 20 min. bzw. 60 min. p.i. permeabilisiert und für die endosomalen bzw. lysosomalen Marker Rab5 und LAMP-1 fluoreszenz-markiert. Intraphagosomale Bakterien wurden in Prozent aller sichtbaren Zell-assoziierten Einzelbakterien erfasst. Die angegebenen Werte repräsentieren Mittelwert und Standardabweichung aus 4 unabhängigen Experimenten von 4 verschiedenen Neutrophilenspendern.

Abbildung 11

Immunfluoreszenzmikroskopie neutrophiler Granulozyten,

intraphagosomale Lokalisation von *M. avium*





Intraphagosomale Prozessierung *M. avium* in neutrophilen Granulozyten 60 min. p.i., neutrophilenassoziierte *M. avium* imponieren als grün fluoreszierende feine Einzelstäbchen. Im Rotfilter erscheinen die assoziierten Vakuolen häufig in einem etwas dominanteren Rot als die restliche Zelle. Eine Kolokalisation (gelb) von *M. avium* mit dem frühen Endosom (Rab5) findet sich sowohl für das hochvirulente AIDS-Isolat SCH 228 als auch für das niedrig virulente Umwelt-Isolat 2442 für die Mehrzahl der in 50 mikroskopischen Feldern erfassten Einzelbakterien (A). Das Umweltisolat 2442 zeigt für den phagolysosomalen Marker LAMP-1 für fast alle erfassten Neutrophilen-assoziierten Bakterien eine Kolokalisation. Für SCH 228 hingegen finden sich nur selten LAMP-1 positive Vakuolen, was impliziert, dass der hochvirulente Stamm nicht effektiv in das reife Phagolysosom prozessiert wird (B).

4 DISKUSSION

4.1 EINFLUSS DER VIRULENZ AUF DIE INTRAZELLULÄRE ABTÖTUNG VON *M. AVIUM* DURCH HUMANE NEUTROPHILE GRANULOZYTEN

Zahlreiche, gut untersuchte Mechanismen erlauben virulenten Mykobakterien die Persistenz und Vermehrung in Makrophagen (siehe 1.6.1), wohingegen avirulente Isolate effektiv von diesen professionellen Phagozyten eliminiert werden^{65,66,71,127}. Hingegen ist der Einfluss der Virulenz von Mykobakterien auf die intrazelluläre Prozessierung nach Phagozytose durch PMNs kaum untersucht. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, die *Killingkapazität* neutrophiler Granulozyten für *M. avium* Isolate unterschiedlicher Virulenz zu untersuchen. Alle hochvirulenten Isolate wurden im Vergleich mit den niedrig virulenten Isolaten signifikant schlechter abgetötet. Während niedrig virulente Isolate nach 120 Minuten zu fast 100% abgetötet waren, war zu diesem Zeitpunkt nur etwa die Hälfte der hochvirulenten Isolate eliminiert. Über die Zeitdauer von 120 Minuten hinaus fand kaum weitere intrazelluläre Abtötung statt, was impliziert, dass die Kapazität neutrophiler Granulozyten, hochvirulente *M. avium* Stämme abzutöten, limitiert ist. Dies ist bisher die einzige vergleichend Untersuchung bezüglich der Killingkapazität von neutrophilen Granulozyten für unterschiedlich virulente Mykobakterien einer Spezies.

4.2 ZYTOKININDUKTION DURCH *M. AVIUM* UNTERSCHIEDLICHER VIRULENZ IN HUMANEN NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN

Um das immunmodulatorische Potential von *M. avium* infizierten Neutrophilen zu untersuchen, wurden die Zytokine, die als typisch neutrophilen Ursprungs bekannt sind, im Überstand der PMNs bestimmt. Ferner sollte der Einfluss der Virulenz auf die

Zytokininduktion untersucht werden, da für Makrophagen ein reziprokes Verhältnis der Sekretion proinflammatorischer Zytokine zur Virulenz von Mykobakterien beschrieben wurde^{109,110}. Gro- α , MIG, TNF- α und TGF- β ließen sich lediglich in Konzentrationen von < 40 pg/ml in den Granulozytenüberständen nachweisen und zeigten keine Unterschiede in der Konzentration für *M. avium* Isolate mit hoher Virulenz gegenüber Isolaten mit niedriger Virulenz. Die Tatsache, dass diese Zytokine, die nicht ausschließlich von Neutrophilen sezerniert werden, in nur geringen bis kaum nachweisbaren Konzentrationen messbar waren, bestätigt die Reinheit der isolierten Granulozyten. Andererseits haben wir lediglich die freien Zytokine im Überstand gemessen, dementsprechend wurde die de novo Synthese der Zytokine als Antwort auf *M. avium* nicht erfasst. Andere Untersucher haben die Induktion von Genexpression für GRO- α und TGF- β in Neutrophilen durch Mykobakterien unterschiedlicher Spezies nachgewiesen^{111,112,113}. GRO- α ist ähnlich wie IL-8 ein starker Chemoattraktant für Neutrophile¹¹⁴ und könnte im Rahmen der Immunantwort auf Mykobakterien die Zahl der Neutrophilen im Focus der Infektion erhöhen. Eines der Schlüsselenzyme in der Immunantwort auf Mykobakterien ist TNF- α . Synergistisch mit INF- γ aktiviert es den Makrophagen, die primäre Wirtszelle von Mykobakterien. Nur der aktivierte Makrophage ist in der Lage, Mykobakterien zu kontrollieren bzw. effektiv abzutöten^{115,116}. Da Neutrophile bei mykobakteriellen Infektionen Frühphasezellen repräsentieren, wäre es also denkbar, dass sie gewebeständige Makrophagen aktivieren^{117,118}. Wir konnten zu keinem der gewählten Zeitpunkte zwischen 15 Minuten und 8 Stunden mehr als 35 pg/ml TNF- α im Überstand der mit *M. avium* infizierten Neutrophilen nachweisen. Wir fanden keinen Unterschied in der TNF- α Induktion zwischen den hochvirulenten und den niedrig virulenten Isolaten. Demgegenüber stehen die Ergebnisse von Fäldt et al., die in Überständen von mit *M. avium* infizierten Neutrophilen nach 4 Stunden über 500 pg/ml TNF- α nachweisen konnten. Darüber

hinaus fand diese Gruppe signifikante Unterschiede in der TNF- α Induktion durch Mykobakterien unterschiedlicher Pathogenität. So induzierte *M. smegmatis* signifikant mehr TNF- α als *M. avium* und Letztere wiederum mehr als *M. tuberculosis*¹¹⁹. Dementsprechend findet sich hier eine Analogie zu dem für Makrophagen beschriebenen Phänomen, dass die Induktion proinflammatorischer Zytokine in einem reziproken Verhältnis zur Virulenz der Mykobakterien steht^{109,110}. Im Gegensatz zu unseren bzw. zu den Ergebnissen von Fäldt stehen die Daten von Suttman et al.. Diese Gruppe konnte nach Stimulation von Neutrophilen mit *M. bovis* BCG TNF- α weder im Microarray noch in der RT-PCR nachweisen¹¹². Ob die Diskordanz dieser Daten letztendlich auf Verunreinigungen in der Zellsuspension (z.B. andere Zellpopulationen, LPS) zurückzuführen ist, bleibt unklar. In Übereinstimmung mit Suttman et al. konnten wir in den Überständen von mit *M. avium* infizierten Neutrophilen die Zytokine IL-8, MIP-1 α , IL-1 β und den Rezeptorantagonisten IL-1ra nachweisen. Alle Isolate induzierten eine starke IL-1 β Antwort unabhängig von ihrer Virulenz. Für IL-8 und MIP-1 α hingegen fanden sich in den Überständen signifikant höhere Konzentrationen nach Infektion der Neutrophilen mit niedrig virulenten Isolaten verglichen mit hoch virulenten Isolaten. Fäldt et. al haben in vergleichenden Untersuchungen mit *M. smegmatis*, *M. avium* und *M. tuberculosis* ebenfalls eine IL-8 Induktion in Neutrophilen festgestellt, die umgekehrt proportional zur Virulenz bzw. Pathogenität der Stämme war. IL-8 ist ein potenter Chemoattraktant für Neutrophile und Monozyten, es spielt eine zentrale Rolle in der Rekrutierung von Leukozyten bei der Granulombildung im Rahmen von Infektionen durch Mykobakterien^{120,121}. Man könnte daher spekulieren, dass die hochvirulenten Stämme über protektive Mechanismen verfügen, welche die IL-8 Induktion herunterregulieren. Folglich würden weniger Neutrophile an den Focus der mykobakteriellen Infektion rekrutiert. In diese Theorie fügen sich auch die Ergebnisse für MIP-1 α und IL-1ra ein. MIP-1 α wurde in den Überständen der mit niedrig virulenten Isolaten infizierten Neutrophilen in

signifikant höheren Konzentrationen nachgewiesen als in den Überständen der mit hochvirulenten Isolaten infizierten Neutrophilen. MIP-1 α ist ein starker Chemoattraktant für Neutrophile, Monozyten, Makrophagen und auch für T-Lymphozyten, es rekrutiert somit nahezu das gesamte Spektrum der Zellen, die in einem komplexen Zusammenspiel an der Immunantwort auf Mykobakterien beteiligt sind¹²². Eine ineffiziente Sekretion von MIP-1 α schwächt dieses System und ist entsprechend von Vorteil für die hochvirulenten Isolate. Im Gegensatz zu IL-8 und MIP-1 α erfolgte die Induktion des IL-1 Rezeptorantagonisten (IL-1ra) direkt proportional zur Virulenz der Isolate. IL-1 ist ein pleotropes Zytokin, das vor allem in der Frühphase einer Infektion apparent wird und in zwei Formen IL-1 α und IL-1 β existiert. Die Hauptquelle dieses proinflammatorischen Zytokins sind Makrophagen. In vivo induziert IL-1 Fieber, führt zur Akkumulation von Neutrophilen und zu einer akuten Entzündungsreaktion¹²³. Die Bedeutung von IL-1 für die effektive Abtötung von *M. avium* konnte im Mausmodell gezeigt werden¹²⁴. IL-1ra ist der natürliche Regulator für die IL-1 Aktivität, der die potentiell schädigenden Effekte von IL-1 im Rahmen einer Entzündungsreaktion limitiert. Er bindet in Konkurrenz mit IL-1 α/β primär an den IL-1 Rezeptor vom Typ I, der für die Signaltransduktion von IL-1 α/β und somit für die Induktion der biologischen Effekte von IL-1 verantwortlich ist¹²⁵. Die starke IL-1ra Induktion in Neutrophilen durch die hoch virulenten Isolate führt dazu, dass die IL-1 vermittelte Immunantwort inhibiert wird. Da die IL-8 Sekretion auch in Abhängigkeit von IL-1 induziert wird, ist die oben beschriebene differenzielle Induktion von IL-8 möglicherweise ein sekundärer Effekt der differenziellen IL-1ra Induktion in Neutrophilen durch die hoch virulenten und niedrig virulenten *M. avium* Isolate. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass neutrophile Granulozyten neben der Fähigkeit *M. avium* direkt abzutöten, eine starke immunmodulierende Wirkung in der Immunantwort auf Mykobakterien haben, die nicht nur die Neutrophilen selbst betrifft, sondern aufgrund des Potentials der induzierten Zytokine andere Zelltypen wie

Monozyten/Makrophagen und T-Zellen mit einbezieht. Offensichtlich können hochvirulente Stämme die neutrophile Immunantwort so manipulieren, dass sie aufgrund einer partiellen Inhibition der Interaktion der Zellen miteinander einen Überlebensvorteil davontragen.

4.3 EINFLUSS DER VIRULENZ VON *M. AVIUM* AUF DIE PHAGOSOMENREIFUNG VON HUMANEN NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN

Die differentielle Zytokinsekretion neutrophiler Granulozyten für hoch und niedrig virulente Isolate von *M. avium* warf die Frage nach Überlebensstrategien des Bakteriums in der Zelle auf. Virulente Mykobakterien können aufgrund verschiedener noch nicht vollständig geklärter Mechanismen in Makrophagen persistieren bzw. sich in diesen replizieren. Es wird postuliert, dass virulente Mykobakterien die Phagosomenentwicklung auf der Interaktionsstufe mit dem frühen Endosom „einfrieren“ können, so dass die Dynamik des Phagosomenreifungsprozesses empfindlich gestört wird und die Bildung eines funktionellen Phagolysosoms verhindert wird^{126,127}. Letzteres besitzt die Kapazitäten, die für die erfolgreiche Degradierung des Pathogens erforderlich sind. Dazu gehören ein sehr niedriger pH-Wert, hydrolytische Enzyme, Defensine und andere bakterizide Peptide und die Fähigkeit zur Generierung toxischer Sauerstoffradikale^{128,129,130}. Um eine mögliche Analogie der Persistenzmechanismen von *M. avium* in Makrophagen und in neutrophilen Granulozyten zu erfassen, haben wir die intraphagosomale Prozessierung von *M. avium* unterschiedlicher Virulenz in neutrophilen Granulozyten mittels der Doppelimmunfluoreszenz untersucht.

Obwohl es einige funktionelle Parallelen gibt, unterscheidet sich die Phagosomenreifung in Makrophagen von der in neutrophilen Granulozyten. Granulozyten enthalten keine konventionellen frühe/späte Endosomen oder Lysosomen. Stattdessen enthalten sie eine Vielzahl spezialisierter Vesikel und

Granula, die im Prozess der Phagozytose degranulieren und ihren enzymreichen Inhalt an die phagozytische Vakuole weitergeben¹³¹. Neutrophile sind mit vier sekretorischen Kompartimenten ausgestattet:

Kompartiment	Inhalt
Azurophile (primäre) Granula	Myeloperoxidase
Spezifische (sekundäre) Granula	Lactoferrin
Tertiäre Granula	Gelatinase
Sekretorische Vesikel	Alkalische Phosphatase

Darüber hinaus sind die *multivesicular bodies* (MVB) und das *multilaminar compartment* (MLC) beschrieben, die sich durch eine charakteristische interne Membran auszeichnen, die das integrale Membranprotein, den lysosomalen Marker LAMP-1 enthält. MVB und MLC sind per definitionem die Lysosomen in Neutrophilen, als Äquivalent zu den späten Endosomen/Lysosomen im Makrophagen¹³². Seit kurzem ist bekannt, dass Rab5 die frühen Fusionsvorgänge von Phagosomen und Granula/Vesikeln in neutrophilen Graulozyten reguliert¹³³. Wir haben die Assoziation von Rab5 und LAMP-1 mit dem Phagosom neutrophiler Granulozyten nach Phagozytose von virulenten und avirulenten *M. avium* Isolatn im Zeitverlauf untersucht. Nach 20 und 60 Minuten waren alle untersuchten Isolate in Rab5 markierten Phagosomen nachweisbar. Dabei fanden sich für die avirulenten Isolate 20 Minuten p.i. mehr Bakterien in Rab5 assoziierten Phagosomen als 60 Minuten p.i., wohingegen für die hoch virulenten Isolate die Verteilung der Bakterien in Rab5 assoziierten Phagosomen für beide Messzeitpunkte nahezu gleich war. Die avirulenten Isolate zeigten nach 20 und 60 Minuten eine Kolokalisation der FITC markierten Bakterien mit dem phagolysosomalen Marker LAMP-1, wobei die Kolokalisation häufiger in den Präparaten für den Zeitpunkt 60 Minuten p.i. beobachtet wurde. Im Gegensatz dazu fanden sich für die hochvirulenten Stämme kaum Kolokalisationen von Bakterien und Phagolysosom. Diese quantitative Verteilung der erfassten Kolokalisationen von *M. avium* mit den unterschiedlichen Entwicklungsstadien der

phagosomalen Vakuole impliziert, dass die niedrig virulenten Isolate im frühen Phagosom/Endosom in das reife Phagolysosom prozessiert werden, wohingegen die vollständige Ausreifung der phagosomalen Vakuole, die hoch virulente Mykobakterien enthält, nur partiell stattfindet. Perskvist et al. haben die intraphagosomale Prozessierung von *M. tuberculosis* (MTB) und *S. aureus* in neutrophilen Granulozyten verglichen¹³³. In Übereinstimmung mit unseren Daten haben sie eine lang anhaltende Assoziation (90 Minuten) des MTB Phagosoms mit Rab5 beobachtet, wohingegen Rab5 auf dem *S. aureus* Phagosom bereits nach 30 Minuten nicht mehr nachweisbar war. Die Autoren postulieren, dass die verlängerte Bindung an den Rab5 Komplex zu einer verzögerten Phagolysosomenreifung führt. Im Gegensatz zu unseren Resultaten konnten Perskvist et al. jedoch LAMP-1 als konsistenten Marker auf allen bakterienhaltigen Vakuolen nachweisen unabhängig davon, ob sie MTB oder *S. aureus* enthielten. Vielmehr beschrieb diese Gruppe eine differentielle Fusion der einzelnen neutrophilen Granula nach Phagozytose von MTB und *S. aureus*. In ihren Untersuchungen konnte das für azurophile Granula typische hck Protein auf MTB-haltigen Phagosomen nur sehr reduziert im Vergleich mit *S. aureus*-haltigen Phagosomen nachgewiesen werden. Diese Beobachtung bestätigt die Untersuchungen von N'Diaye et al., die in der Immunoelektronenmikroskopie neben der fehlenden Assoziation des hck Proteins auch einen Mangel der für azurophile Granula typischen Myeloperoxidase in neutrophilen Phagosomen nach Phagozytose der nicht pathogenen Spezies *M. smegmatis* und *M. phlei* sowie der pathogenen Spezies *M. kansasii* und *M. avium* nachwiesen¹⁰⁴. Auf diesen Daten basiert die These, dass pathogene und nicht pathogene Mykobakterien dieselben bakteriziden Mechanismen in Neutrophilen triggern und dass Mykobakterien in der Lage sind, die Phagozytose und die anschließende Fusion mit azurophilen Granula distinkt zu entkoppeln, wohingegen die Fusion mit allen übrigen Granula/Vesikeln vollzogen wird. Auf diese Weise könnten Mykobakterien den zahlreichen lysosomalen Enzymen und

bakteriziden Faktoren der azurophilen Granula entgehen. Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Perskvist et al., deren Untersuchungen an isolierten extrazellulären Phagosomen vorgenommen wurden, erfolgten unsere Experimente, abgesehen von der zur Markierung der Phagosomen notwendigen Permeabilisierung der Zellmembran, an der intakten Zelle. Von der Phagosomenreifung im Makrophagen ist bekannt, dass Strukturen des Zytoskeletts, wie Mikrotubuli und Mikrofilamente, durch ihre Polarität und Beweglichkeit die Vakuolen zu einer gerichteten Fusion dirigieren¹³⁴. Die Bedeutung von Aktinfilamenten für die Phagozytose und Phagosomenentwicklung bei neutrophilen Granulozyten wurde kürzlich ausführlich beschrieben¹³⁵. Untersuchungen an isolierten extrazellulären Phagosomen können diesen dynamischen Prozessen kaum Rechnung tragen. Wir konnten zeigen, dass virulente *M. avium* Isolate neutrophile Granulozyten funktionell beeinflussen und dadurch einer effektiven intrazellulären Abtötung entgehen. Ob diese funktionelle Beeinflussung spezifischen Virulenzfaktoren zuzuschreiben ist, und welche Mechanismen im Einzelnen für das veränderte physiologische Verhalten der Neutrophilen verantwortlich sind, bedarf weiterer Klärung.

4.4 FAZIT UND AUSBLICK

In der Zusammenschau der Ergebnisse konnte diese Arbeit zeigen, dass neutrophile Granulozyten nach Exposition mit *M. avium* durch die Freisetzung von primär proinflammatorischen Zytokinen eine hohe immunmodulierende Wirkung besitzen. Diese bezieht den Neutrophilen selbst als Targetzelle aber auch andere Vertreter des unspezifischen und spezifischen Immunsystems, wie Monozyten/Makrophagen und T-Zellen, mit ein. Ähnlich wie auch für Makrophagen beschrieben, können sich virulente Isolate von *M. avium* der Immunantwort neutrophiler Granulozyten zumindest partiell entziehen. Die Mechanismen, durch die *M. avium* die Immunantwort neutrophiler Granulozyten manipuliert, bedürfen weiterer Untersuchungen.

Auf der Basis der in dieser Arbeit erhobenen Daten und der Tatsache, dass die G-CSF unterstützte Therapie von *M. avium* Infektionen einen signifikanten Überlebensvorteil für die Patienten bedeutet, könnte im Einsatz immunmodulatorischer Faktoren ein therapeutisches Potential für Infektionen mit *M. avium* liegen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Vertreter des *Mycobacterium avium* complex (MAC) sind opportunistische Keime bei immunsupprimierten Individuen. Seine größte Bedeutung erlangte MAC im Rahmen der AIDS-Pandemie als lebensbedrohlicher Erreger bei HIV-infizierten Patienten. Nach einem, durch die Einführung der HAART bedingten, Rückgang der Inzidenz wird aktuell eine Renaissance von MAC Infektionen in der HIV-infizierten Population der westlichen Welt beobachtet. Darüber hinaus steigt die Inzidenz von MAC Infektionen auch bei immunkompetenten Patienten, die in der Regel pulmonale Manifestationen auf dem Boden einer pulmonalen Prädisposition erfahren. Bronchiektasen, COPD, Silikose und die zystische Fibrose sind ein bedeutender Cofaktor für MAC Infektionen.

M. avium ist ein fakultativ intrazellulärer Erreger, dem vorzugsweise Makrophagen und Monozyten als Wirtszellen dienen, der aber auch in nicht professionellen Phagozyten persistieren kann. Zahlreiche Untersuchungen, vornehmlich im Mausmodell, zeigen, dass monozytäre Zellen in Abhängigkeit von der Empfänglichkeit der Tiere und der Virulenz des Erregers entweder als Killer- oder als Wirtszellen fungieren.

Neutrophile Granulozyten sind die erste Linie der Verteidigung gegen mikrobielle Pathogene, dennoch wurde ihnen lange Zeit keine Bedeutung bei Infektionen mit intrazellulären Erregern zugeschrieben. Neuere Untersuchungen in Tiermodellen, in vitro Studien mit humanen Granulozyten sowie klinische Beobachtungen lieferten Hinweise darauf, dass Neutrophile einen direkten Beitrag zur Eliminierung von Mykobakterien leisten. Die Bedeutung dieses Beitrages und seine Einordnung in den Hintergrund der bisher bekannten Patho- und Immunmechanismen für Mykobakteriosen ist ungeklärt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten zeigen, dass *M. avium* durch humane neutrophile Granulozyten in Abhängigkeit von seiner Virulenz effektiv intrazellulär abgetötet wird. Ebenso zeigten die Untersuchungen dieser Arbeit, dass die Exposition von *M. avium* und neutrophilen Granulozyten zur Induktion zahlreicher Zytokine führt, deren autokrine und parakrine Effekte bekanntermaßen PMNs, aber auch gewebeständige Makrophagen als Zielzellen haben.

Zahlreiche, gut untersuchte Mechanismen erlauben virulenten Mykobakterien die Persistenz und Vermehrung in Makrophagen, wohingegen avirulente Isolate effektiv von diesen professionellen Phagozyten eliminiert werden. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, den Einfluss der Virulenz von *M. avium* Isolaten auf die *Killingkapazität* neutrophiler Granulozyten zu untersuchen. Alle hoch virulenten Isolate wurden im Vergleich mit den niedrig virulenten Isolaten signifikant schlechter abgetötet. Mit diesen Ergebnissen korrelierte die Induktion proinflammatorischer Zytokine nach Exposition von *M. avium* mit neutrophilen Granulozyten. Für IL-8 und MIP-1 α fanden sich in den Überständen signifikant höhere Konzentrationen nach Infektion der Neutrophilen mit niedrig virulenten Isolaten verglichen mit hoch virulenten Isolaten. IL-8 ist ein potenter Chemoattraktant für Neutrophile und Monozyten, es spielt eine zentrale Rolle in der Rekrutierung von Leukozyten bei der Granulombildung im Rahmen von Infektionen durch Mykobakterien. Ferner inhibiert IL-8 neben anderen proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 β , G-CSF und G-MCSF, die spontane Apoptose neutrophiler Granulozyten. MIP-1 α ist ein starker Chemoattraktant für Neutrophile, Monozyten, Makrophagen und auch für T-Lymphozyten, es rekrutiert somit nahezu das gesamte Spektrum der Zellen, die in einem komplexen Zusammenspiel an der Immunantwort auf Mykobakterien beteiligt sind. Die Daten dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die hochvirulenten Stämme über protektive Mechanismen verfügen, welche die IL-8 und MIP-1 α Induktion herunterregulieren. Folglich würden weniger Neutrophile, Monozyten/Makrophagen und T-Zellen an den

Focus der mykobakteriellen Infektion rekrutiert. Ferner würden die Neutrophilen schneller in Apoptose gehen und die Mykobakterien noch vor ihrer effizienten Abtötung wieder freisetzen. Im Gegensatz zu IL-8 und MIP-1 α erfolgte die Induktion des IL-1 Rezeptorantagonisten (IL-1ra) direkt proportional zur Virulenz der Isolate, während alle Isolate IL-1 β unabhängig von ihrer Virulenz induzierten. IL-1 ist ein potentes proinflammatorisches Zytokin, das in vivo im Rahmen einer akuten Entzündungsreaktion Fieber induziert und zur Akkumulation von Neutrophilen führt. Es induziert sich selbst in einer autokrinen und parakrinen Manier und ist zudem ein starker Induktor der IL-8 Sekretion in verschiedenen Zellen, was wiederum zur akuten Neutrophilie führt. Die Bedeutung von IL-1 für die effektive Abtötung von *M. avium* konnte im Mausmodell gezeigt werden. IL-1ra ist der natürliche Regulator für die IL-1 Aktivität, der die potentiell schädigenden Effekte von IL-1 im Rahmen einer Entzündungsreaktion limitiert. Die starke IL-1ra Induktion in Neutrophilen durch die hoch virulenten Isolate führt dazu, dass die IL-1 vermittelte Immunantwort inhibiert wird. Da die IL-8 Sekretion auch in Abhängigkeit von IL-1 induziert wird, ist die in dieser Arbeit beschriebene differenzielle Induktion von IL-8 möglicherweise ein sekundärer Effekt der differenziellen IL-1ra Induktion in Neutrophilen durch die hoch virulenten und niedrig virulenten *M. avium* Isolate. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass neutrophile Granulozyten neben der Fähigkeit, *M. avium* direkt abzutöten, eine starke immunmodulierende Wirkung in der Immunantwort auf Mykobakterien haben, die nicht nur die Neutrophilen selbst betrifft, sondern, aufgrund des Potentials der induzierten Zytokine, andere Zelltypen, wie Monozyten/Makrophagen und T-Zellen, mit einbezieht. Offensichtlich können hoch virulente Stämme, die neutrophile Immunantwort so manipulieren, dass sie aufgrund einer partiellen Inhibition der Interaktion der Zellen miteinander einen Überlebensvorteil davontragen.

Die These, dass virulente *M. avium* Isolate anders als avirulente Isolate mit neutrophilen Granulozyten interagieren, konnte in dieser Arbeit durch die Untersuchungen zur phagosomalen Prozessierung der Isolate bestätigt werden.

Die phagosomale Prozessierung von *M. avium* wurde in der Doppelimmunfluoreszenz mittels eines Frühmarkers (Rab5) und eines Spätmarkers (LAMP-1) der Phagosomenentwicklung untersucht. Dabei wurde die Assoziation von Rab5 und LAMP-1 mit FITC markiertem intraphagosomalem *M. avium* quantitativ im Zeitverlauf erfasst. Avirulente *M. avium* Isolate zeigten nur eine temporäre Assoziation mit Rab5 im Zeitverlauf. Nach 60 Minuten hatte hier eine weitgehende Dissoziation dieses Markers zu Gunsten von LAMP-1 stattgefunden. Die Assoziation von Rab5 mit den Phagosomen, die hoch virulente Isolate von *M. avium* enthielten, nahm jedoch im Zeitverlauf zu, wohingegen sich nur wenige LAMP-1 positive Phagosomen fanden. Diese quantitative Verteilung der erfassten Koloalisationen von *M. avium* mit den unterschiedlichen Entwicklungsstadien der phagosomalen Vakuole impliziert, dass die niedrig virulenten Isolate im frühen Phagosom/Endosom in das reife Phagolysosom prozessiert werden, wohingegen die vollständige Ausreifung der phagosomalen Vakuole, die hoch virulente Mykobakterien enthält, nur partiell stattfindet.

Ein besseres Verständnis der immunmodulatorischen Mechanismen neutrophiler Granulozyten bei mykobakteriellen Infektionen könnte dazu beitragen, die immer noch sehr beschränkten therapeutischen Möglichkeiten für Mykobakteriosen zu erweitern.

-
- 1 **Nerlich AG, Haas CJ, Zink A, Szeimies U, Hagedorn HG.** Molecular evidence for tuberculosis in an ancient Egyptian mummy. *Lancet*. 1997;350(9088):1404.
- 2 **Teschner M.** [Tuberculosis in ancient Hebrew scrolls]. *Pneumologie*. 2003;57(10):612-617.
- 3 **Koch R.** Classics in infectious diseases. The etiology of tuberculosis: Robert Koch. Berlin, Germany 1882. *Rev Infect Dis*. 1982;4(6):1270-1274.
- 4 **Feldmann.** An unusual mycobacterium isolatet from sputum of a man suffering from pulmonary disease of long duration. *Am Rev Tuberc*. 1943;48:82-93.
- 5 **Wolinsky E.** Mycobacterial diseases other than tuberculosis. *Clin Infect Dis*. 1992;15(1):1-10.
- 6 **Dore GJ, Li Y, McDonald A, Ree H, Kaldor JM.** Impact of highly active antiretroviral therapy on individual AIDS-defining illness incidence and survival in Australia. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2002;29(4):388-395.
- 7 **Horsburgh CR, Jr., Gettings J, Alexander LN, Lennox JL.** Disseminated Mycobacterium avium complex disease among patients infected with human immunodeficiency virus, 1985-2000. *Clin Infect Dis*. 2001;33(11):1938-1943.
- 8 **Torre D, Speranza F, Martegani R.** Impact of highly active antiretroviral therapy on organ-specific manifestations of HIV-1 infection. *HIV Med*. 2005;6(2):66-78.
- 9 **Jie T, Matas AJ, Gillingham KJ, Sutherland DE, Dunn DL, Humar A.** Mycobacterial infections after kidney transplant. *Transplant Proc*. 2005;37(2):937-939.
- 10 **Roy V, Weisdorf D.** Mycobacterial infections following bone marrow transplantation: a 20 year retrospective review. *Bone Marrow Transplant*. 1997;19(5):467-470.
- 11 **Timpe A, Runyon EH.** The relationship of atypical acid-fast bacteria to human disease; a preliminary report. *J Lab Clin Med*. 1954;44(2):202-209
- 12 **Inderlied CB, Kemper CA, Bermudez LE.** The Mycobacterium avium complex. *Clin Microbiol Rev*. 1993;6(3):266-310.
- 13 **Falkinham JO, 3rd, Norton CD, LeChevallier MW.** Factors influencing numbers of Mycobacterium avium, Mycobacterium intracellulare, and other Mycobacteria in drinking water distribution systems. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67(3):1225-1231.
- 14 **Falkinham JO, 3rd.** Nontuberculous mycobacteria in the environment. *Clin Chest Med*. 2002;23(3):529-551.
- 15 **Kirschner RA, Jr., Parker BC, Falkinham JO, 3rd.** Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. Mycobacterium avium, Mycobacterium intracellulare, and Mycobacterium scrofulaceum in acid, brown-water swamps of the southeastern United States and their association with environmental variables. *Am Rev Respir Dis*. 1992;145(2 Pt 1):271-275.
- 16 **Denner JC, Tsang AY, Chatterjee D, Brennan PJ.** Comprehensive approach to identification of serovars of Mycobacterium avium complex. *J Clin Microbiol*. 1992;30(2):473-478.

-
- 17 **Haddad N, Masselot M, Durand B.** Molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates. Review of main techniques and applications. *Res Vet Sci.* 2004;76(1):1-18.
- 18 **George KL, Parker BC, Gruft H, Falkinham JO, 3rd.** Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. II. Growth and survival in natural waters. *Am Rev Respir Dis.* 1980;122(1):89-94.
- 19 Respiratory illness in workers exposed to metalworking fluid contaminated with nontuberculous mycobacteria--Ohio, 2001. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2002;51(16):349-352.
- 20 From the Centers for Diseases Control and Prevention. Respiratory illness in workers exposed to metalworking fluid contaminated with nontuberculous mycobacteria in Ohio, 2001. *Jama.* 2002;287(23):3073-3074.
- 21 **Combourieu B, Besse P, Sancelme M, Veschambre H, Delort AM, Poupin P, Truffaut N.** Morpholine degradation pathway of *Mycobacterium aurum* MO1: direct evidence of intermediates by in situ ¹H nuclear magnetic resonance. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64(1):153-158.
- 22 **du Moulin GC, Stottmeier KD, Pelletier PA, Tsang AY, Hedley-Whyte J.** Concentration of *Mycobacterium avium* by hospital hot water systems. *Jama.* 1988;260(11):1599-1601.
- 23 **Guerin WF, Jones GE.** Mineralization of phenanthrene by a *Mycobacterium* sp. *Appl Environ Microbiol.* 1988;54(4):937-944.
- 24 **Havelaar AH, Berwald LG, Groothuis DG, Baas JG.** Mycobacteria in semi-public swimming-pools and whirlpools. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [B].* 1985;180(5-6):505-514.
- 25 **Schulze-Robbecke R, Fischeder R.** Mycobacteria in biofilms. *Zentralbl Hyg Umweltmed.* 1989;188(3-4):385-390.
- 26 **Yajko DM, Chin DP, Gonzalez PC, Nassos PS, Hopewell PC, Reingold AL, Horsburgh CR, Jr., Yakus MA, Ostroff SM, Hadley WK.** *Mycobacterium avium* complex in water, food, and soil samples collected from the environment of HIV-infected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1995;9(2):176-182.
- 27 **Brennan PJ, Nikaido H.** The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem.* 1995;64:29-63.
- 28 **Falkinham JO, 3rd, Norton CD, LeChevallier MW.** Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other *Mycobacteria* in drinking water distribution systems. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67(3):1225-1231.
- 29 **Schulze-Robbecke R, Fischeder R.** Mycobacteria in biofilms. *Zentralbl Hyg Umweltmed.* 1989;188(3-4):385-390.
- 30 **Taylor RH, Falkinham JO, 3rd, Norton CD, LeChevallier MW.** Chlorine, chloramine, chlorine dioxide, and ozone susceptibility of *Mycobacterium avium*. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(4):1702-1705.
- 31 **Young HK.** Antimicrobial resistance spread in aquatic environments. *J Antimicrob Chemother.* 1993;31(5):627-635.
- 32 **Schulze-Robbecke R, Buchholtz K.** Heat susceptibility of aquatic mycobacteria. *Appl*

-
- Environ Microbiol.* 1992;58(6):1869-1873.
- 33 **Cirillo JD, Falkow S, Tompkins LS, Bermudez LE.** Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect Immun.* 1997;65(9):3759-3767.
- 34 **Strahl ED, Gillaspay GE, Falkinham JO, 3rd.** Fluorescent acid-fast microscopy for measuring phagocytosis of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum* by *Tetrahymena pyriformis* and their intracellular growth. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67(10):4432-4439.
- 35 **Biet F, Boschirolu ML, Thorel MF, Guilloteau LA.** Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Vet Res.* 2005;36(3):411-436.
- 36 **Elwood RK, Opazo Saez AM, Lentini V, Shadmani R.** Incidence of pulmonary disease caused by mycobacteria other than tuberculosis in British Columbia. *Can Respir J.* 2002;9(5):319-323.
- 37 **Marras TK, Daley CL.** Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria. *Clin Chest Med.* 2002;23(3):553-567.
- 38 **Field SK, Fisher D, Cowie RL.** *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease in patients without HIV infection. *Chest.* 2004;126(2):566-581.
- 39 **Marras TK, Wallace RJ, Jr., Koth LL, Stulbarg MS, Cowl CT, Daley CL.** Hypersensitivity pneumonitis reaction to *Mycobacterium avium* in household water. *Chest.* 2005;127(2):664-671.
- 40 **Ebert DL, Olivier KN.** Nontuberculous mycobacteria in the setting of cystic fibrosis. *Clin Chest Med.* 2002;23(3):655-663.
- 41 **Field SK, Fisher D, Cowie RL.** *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease in patients without HIV infection. *Chest.* 2004;126(2):566-581.
- 42 **Contreras MA, Cheung OT, Sanders DE, Goldstein RS.** Pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria. *Am Rev Respir Dis.* 1988;137(1):149-152.
- 43 **Rosenzweig DY.** Pulmonary mycobacterial infections due to *Mycobacterium intracellulare-avium* complex. Clinical features and course in 100 consecutive cases. *Chest.* 1979;75(2):115-119.
- 44 **Kubo K, Yamazaki Y, Hachiya T, Hayasaka M, Honda T, Hasegawa M, Sone S.** *Mycobacterium avium-intracellulare* pulmonary infection in patients without known predisposing lung disease. *Lung.* 1998;176(6):381-391.
- 45 **Reich JM, Johnson RE.** *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease presenting as an isolated lingular or middle lobe pattern. The Lady Windermere syndrome. *Chest.* 1992;101(6):1605-1609.
- 46 **Falkinham JO, 3rd.** Mycobacterial aerosols and respiratory disease. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(7):763-767.
- 47 **Phillips MS, von Reyn CF.** Nosocomial infections due to nontuberculous mycobacteria. *Clin Infect Dis.* 2001;33(8):1363-1374.
- 48 **Chan ED, Kong PM, Fennelly K, Dwyer AP, Iseman MD.** Vertebral osteomyelitis due

-
- to infection with nontuberculous *Mycobacterium* species after blunt trauma to the back: 3 examples of the principle of locus minoris resistentiae. *Clin Infect Dis*. 2001;32(10):1506-1510
- 49 **Munoz RM, Alonso-Pulpon L, Yebra M, Segovia J, Gallego JC, Daza RM.** Intestinal involvement by nontuberculous mycobacteria after heart transplantation. *Clin Infect Dis*. 2000;30(3):603-605.
- 50 **Horsburgh CR, Jr., Havlik JA, Ellis DA, Kennedy E, Fann SA, Dubois RE, Thompson SE.** Survival of patients with acquired immune deficiency syndrome and disseminated *Mycobacterium avium* complex infection with and without antimycobacterial chemotherapy. *Am Rev Respir Dis*. 1991;144(3 Pt 1):557-559.
- 51 **Jacobson MA, Hopewell PC, Yajko DM, Hadley WK, Lazarus E, Mohanty PK, Modin GW, Feigal DW, Cusick PS, Sande MA.** Natural history of disseminated *Mycobacterium avium* complex infection in AIDS. *J Infect Dis*. 1991;164(5):994-998.
- 52 **Nightingale SD, Byrd LT, Southern PM, Jockusch JD, Cal SX, Wynne BA.** Incidence of *Mycobacterium avium*-intracellulare complex bacteremia in human immunodeficiency virus-positive patients. *J Infect Dis*. 1992;165(6):1082-1085.
- 53 **Horsburgh CR, Jr.** *Mycobacterium avium* complex infection in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med*. 1991;324(19):1332-1338.
- 54 **Horsburgh CR, Jr., Selik RM.** The epidemiology of disseminated nontuberculous mycobacterial infection in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Am Rev Respir Dis*. 1989;139(1):4-7.
- 55 **Kalayjian RC, Toossi Z, Tomashefski JF, Jr., Carey JT, Ross JA, Tomford JW, Blinkhorn RJ, Jr.** Pulmonary disease due to infection by *Mycobacterium avium* complex in patients with AIDS. *Clin Infect Dis*. 1995;20(5):1186-1194.
- 56 **Chaisson RE, Gallant JE, Keruly JC, Moore RD.** Impact of opportunistic disease on survival in patients with HIV infection. *Aids*. 1998;12(1):29-33.
- 57 **Karakousis PC, Moore RD, Chaisson RE.** *Mycobacterium avium* complex in patients with HIV infection in the era of highly active antiretroviral therapy. *Lancet Infect Dis*. 2004;4(9):557-565.
- 58 **Horsburgh CR, Jr.** The pathophysiology of disseminated *Mycobacterium avium* complex disease in AIDS. *J Infect Dis*. 1999;179 Suppl 3:S461-465.
- 59 **Bodmer T, Miltner E, Bermudez LE.** *Mycobacterium avium* resists exposure to the acidic conditions of the stomach. *FEMS Microbiol Lett*. 2000;182(1):45-49.
- 60 **Sangari FJ, Goodman J, Bermudez LE.** *Mycobacterium avium* enters intestinal epithelial cells through the apical membrane, but not by the basolateral surface, activates small GTPase Rho and, once within epithelial cells, expresses an invasive phenotype. *Cell Microbiol*. 2000;2(6):561-568.
- 61 **Bermudez LE, Young LS, Enkel H.** Interaction of *Mycobacterium avium* complex with human macrophages: roles of membrane receptors and serum proteins. *Infect Immun*. 1991;59(5):1697-1702.
- 62 **Griffiths G, Gruenberg J.** The arguments for pre-existing early and late endosomes. *Trends Cell Biol*. 1991;1(1):5-9.

-
- 63 **Murphy RF.** Maturation models for endosome and lysosome biogenesis. *Trends Cell Biol.* 1991;1(4):77-82.
- 64 **Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC.** Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood.* 1998;92(9):3007-3017.
- 65 **Ferrari G, Langen H, Naito M, Pieters J.** A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell.* 1999;97(4):435-447.
- 66 **Fratti RA, Chua J, Vergne I, Deretic V.** Mycobacterium tuberculosis glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(9):5437-5442.
- 67 **Birkeland HC, Stenmark H.** Protein targeting to endosomes and phagosomes via FYVE and PX domains. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2004;282:89-115.
- 68 **Chua J, Deretic V.** Mycobacterium tuberculosis reprograms waves of phosphatidylinositol 3-phosphate on phagosomal organelles. *J Biol Chem.* 2004;279(35):36982-36992.
- 69 **Itoh T, Takenawa T.** Phosphoinositide-binding domains: Functional units for temporal and spatial regulation of intracellular signalling. *Cell Signal.* 2002;14(9):733-743.
- 70 **Wurmser AE, Gary JD, Emr SD.** Phosphoinositide 3-kinases and their FYVE domain-containing effectors as regulators of vacuolar/lysosomal membrane trafficking pathways. *J Biol Chem.* 1999;274(14):9129-9132.
- 71 **Briken V, Porcelli SA, Besra GS, Kremer L.** Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Mol Microbiol.* 2004;53(2):391-403.
- 72 **Zerial M, McBride H.** Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(2):107-117.
- 73 **Vieira OV, Botelho RJ, Grinstein S.** Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem J.* 2002;366(Pt 3):689-704.
- 74 **Mellman I, Fuchs R, Helenius A.** Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu Rev Biochem.* 1986;55:663-700.
- 75 **Deretic V, Fratti RA.** Mycobacterium tuberculosis phagosome. *Mol Microbiol.* 1999;31(6):1603-1609.
- 76 **Raviglione Mario C. , O´ Brien Richard J.** Tuberkulose, Pathogenes und Immunität, Harrisons Innere Medizin 2003: 1131
- 77 **Sousa AO, Mazzaccaro RJ, Russell RG, Lee FK, Turner OC, Hong S, Van Kaer L, Bloom BR.** Relative contributions of distinct MHC class I-dependent cell populations in protection to tuberculosis infection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(8):4204-4208.
- 78 **Teitelbaum R, Cammer M, Maitland ML, Freitag NE, Condeelis J, Bloom BR.** Mycobacterial infection of macrophages results in membrane-permeable phagosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(26):15190-15195.
- 79 **Cho S, Mehra V, Thoma-Uszynski S, Stenger S, Serbina N, Mazzaccaro RJ, Flynn JL, Barnes PF, Southwood S, Celis E, Bloom BR, Modlin RL, Sette A.** Antimicrobial

-
- activity of MHC class I-restricted CD8+ T cells in human tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(22):12210-12215.
- 80 **Flesch IE, Kaufmann SH.** Activation of tuberculostatic macrophage functions by gamma interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor. *Infect Immun*. 1990;58(8):2675-2677.
- 81 **Fenton MJ, Vermeulen MW.** Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infect Immun*. 1996;64(3):683-690.
- 82 **adel CH, Szalay G, Riedel D, Kaufmann SH.** Interleukin-12 secretion by Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages. *Infect Immun*. 1997;65(5):1936-1938.
- 83 **Feng CG, Jankovic D, Kullberg M, Cheever A, Scanga CA, Hieny S, Caspar P, Yap GS, Sher A.** Maintenance of pulmonary Th1 effector function in chronic tuberculosis requires persistent IL-12 production. *J Immunol*. 2005;174(7):4185-4192.
- 84 **Bermudez LE.** Production of transforming growth factor-beta by Mycobacterium avium-infected human macrophages is associated with unresponsiveness to IFN-gamma. *J Immunol*. 1993;150(5):1838-1845.
- 85 **Weiss DJ, Evanson OA, de Souza C, Abrahamsen MS.** A critical role of interleukin-10 in the response of bovine macrophages to infection by Mycobacterium avium subsp paratuberculosis. *Am J Vet Res*. 2005;66(4):721-726.
- 86 **Bermudez LE, Wu M, Petrofsky M, Young LS.** Interleukin-6 antagonizes tumor necrosis factor-mediated mycobacteriostatic and mycobactericidal activities in macrophages. *Infect Immun*. 1992;60(10):4245-4252.
- 87 **Appelberg R, Castro AG, Gomes S, Pedrosa J, Silva MT.** Susceptibility of beige mice to Mycobacterium avium: role of neutrophils. *Infect Immun*. 1995;63(9):3381-3387.
- 88 **Conlan JW.** Critical roles of neutrophils in host defense against experimental systemic infections of mice by Listeria monocytogenes, Salmonella typhimurium, and Yersinia enterocolitica. *Infect Immun*. 1997;65(2):630-635.
- 89 **Vorwald A.** The early cellular reactions in the lungs of rabbits injected intravenously with human tubercle bacilli. *Am Rev Tuberc*. 1932;25:74-88.
- 90 **Sibirnaia RI.** [Phagocytic activity of leukocytes in animals infected with *M. avium* and *M. scrofulaceum*]. *Probl Tuberk*. 1991(1):60-62.
- 91 **Silva MT, Silva MN, Appelberg R.** Neutrophil-macrophage cooperation in the host defence against mycobacterial infections. *Microb Pathog*. 1989;6(5):369-380.
- 92 **Petrofsky M, Bermudez LE.** Neutrophils from Mycobacterium avium-infected mice produce TNF-alpha, IL-12, and IL-1 beta and have a putative role in early host response. *Clin Immunol*. 1999;91(3):354-358.
- 93 **Sugawara I, Udagawa T, Yamada H.** Rat neutrophils prevent the development of tuberculosis. *Infect Immun*. 2004;72(3):1804-1806.
- 94 **Petrofsky M, Bermudez LE.** Neutrophils from Mycobacterium avium-infected mice produce TNF-alpha, IL-12, and IL-1 beta and have a putative role in early host response. *Clin Immunol*. 1999;91(3):354-358.

-
- 95 **Keiser P, Rademacher S, Smith J, Skiest D.** G-CSF association with prolonged survival in HIV-infected patients with disseminated *Mycobacterium avium* complex infection. *Int J STD AIDS*. 1998;9(7):394-399.
- 96 **Denis M.** Human neutrophils, activated with cytokines or not, do not kill virulent *Mycobacterium tuberculosis* [letter; comment]. *J Infect Dis*. 1991;163(4):919-920.
- 97 **Pedrosa J, Saunders BM, Appelberg R, Orme IM, Silva MT, Cooper AM.** Neutrophils play a protective nonphagocytic role in systemic *Mycobacterium tuberculosis* infection of mice. *Infect Immun*. 2000;68(2):577-583.
- 98 **Brown AE, Holzer TJ, Andersen BR.** Capacity of human neutrophils to kill *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*. 1987;156(6):985-989.
- 99 **George S, Coffey M, Cinti S, Collins J, Brown M, Kazanjian P.** Neutrophils from AIDS patients treated with granulocyte colony-stimulating factor demonstrate enhanced killing of *Mycobacterium avium* [published erratum appears in *J Infect Dis* 1999 May;179(5):1315]. *J Infect Dis*. 1998;178(5):1530-1533.
- 100 **Hartmann P, Becker R, Franzen C, Schell-Frederick E, Romer J, Jacobs M, Fatkenheuer G, Plum G.** Phagocytosis and killing of *Mycobacterium avium* complex by human neutrophils. *J Leukoc Biol*. 2001 Mar;69(3):397-404.
- 101 **Geertsma MF, Nibbering PH, Pos O, Van Furth R.** Interferon-gamma-activated human granulocytes kill ingested *Mycobacterium fortuitum* more efficiently than normal granulocytes. *Eur J Immunol*. 1990;20(4):869-873.
- 102 **Le Cabec V, Cols C, Maridonneau-Parini I.** Nonopsonic phagocytosis of zymosan and *Mycobacterium kansasii* by CR3 (CD11b/CD18) involves distinct molecular determinants and is or is not coupled with NADPH oxidase activation. *Infect Immun*. 2000;68(8):4736-4745.
- 103 **Majeed M, Perskvist N, Ernst JD, Orselius K, Stendahl O.** Roles of calcium and annexins in phagocytosis and elimination of an attenuated strain of *Mycobacterium tuberculosis* in human neutrophils. *Microb Pathog*. 1998;24(5):309-320.
- 104 **N'Diaye EN, Darzacq X, Astarie-Dequeker C, Daffe M, Calafat J, Maridonneau-Parini I.** Fusion of azurophilic granules with phagosomes and activation of the tyrosine kinase Hck are specifically inhibited during phagocytosis of mycobacteria by human neutrophils. *J Immunol*. 1998;161(9):4983-4991.
- 105 **May ME, Spagnuolo PJ.** Evidence for activation of a respiratory burst in the interaction of human neutrophils with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 1987;55(9):2304-2307.
- 106 **Graw RG, Jr., Herzig GP, Eisel RJ, Perry S.** Leukocyte and platelet collection from normal donors with the continuous flow blood cell separator. *Transfusion*. 1971;11(2):94-101.
- 107 **Sanderson RJ, Shepperdson RT, Vatter AE, Talmage DW.** Isolation and enumeration of peripheral blood monocytes. *J Immunol*. 1977;118(4):1409-1414.
- 108 **Crowle AJ, Tsang AY, Vatter AE, May MH.** Comparison of 15 laboratory and patient-derived strains of *Mycobacterium avium* for ability to infect and multiply in cultured human macrophages. *J Clin Microbiol*. 1986;24(5):812-821.
- 109 **Beltan E, Horgen L, Rastogi N.** Secretion of cytokines by human macrophages upon

-
- infection by pathogenic and non-pathogenic mycobacteria. *Microb Pathog.* 2000;28(5):313-318.
- 110 **Fattorini L, Xiao Y, Li B, Santoro C, Ippoliti F, Orefici G.** Induction of IL-1 beta, IL-6, TNF-alpha, GM-CSF and G-CSF in human macrophages by smooth transparent and smooth opaque colonial variants of *Mycobacterium avium*. *J Med Microbiol.* 1994;40(2):129-133.
- 111 **Riedel DD, Kaufmann SH.** Chemokine secretion by human polymorphonuclear granulocytes after stimulation with *Mycobacterium tuberculosis* and lipoarabinomannan. *Infect Immun.* 1997;65(11):4620-4623.
- 112 **Suttman H, Lehan N, Bohle A, Brandau S.** Stimulation of neutrophil granulocytes with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin induces changes in phenotype and gene expression and inhibits spontaneous apoptosis. *Infect Immun.* 2003;71(8):4647-4656.
- 113 **Kasahara K, Sato I, Ogura K, Takeuchi H, Kobayashi K, Adachi M.** Expression of chemokines and induction of rapid cell death in human blood neutrophils by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis.* 1998;178(1):127-137.
- 114 **Fujiwara K, Matsukawa A, Ohkawara S, Takagi K, Yoshinaga M.** Functional distinction between CXC chemokines, interleukin-8 (IL-8), and growth related oncogene (GRO)alpha in neutrophil infiltration. *Lab Invest.* 2002;82(1):15-23.
- 115 **Denis M, Gregg EO, Ghandirian E.** Cytokine modulation of *Mycobacterium tuberculosis* growth in human macrophages. *Int J Immunopharmacol.* 1990;12(7):721-727.
- 116 **Raja A.** Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res.* 2004;120(4):213-232.
- 117 **May ME, Spagnuolo PJ.** Evidence for activation of a respiratory burst in the interaction of human neutrophils with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1987;55(9):2304-2307.
- 118 **Fulton SA, Reba SM, Martin TD, Boom WH.** Neutrophil-mediated mycobacteriocidal immunity in the lung during *Mycobacterium bovis* BCG infection in C57BL/6 mice. *Infect Immun.* 2002;70(9):5322-5327.
- 119 **Fäldt J, Dahlgren C, Ridell M.** Difference in neutrophil cytokine production induced by pathogenic and non-pathogenic mycobacteria. *APMIS* 2002;110:593-600.
- 120 **Stevenson NJ, Haan S, McClurg AE, McGrattan MJ, Armstrong MA, Heinrich PC, Johnston JA.** The chemoattractants, IL-8 and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, regulate granulocyte colony-stimulating factor signaling by inducing suppressor of cytokine signaling-1 expression. *J Immunol.* 2004;173(5):3243-3249.
- 121 **Lin F, Nguyen CM, Wang SJ, Saadi W, Gross SP, Jeon NL.** Effective neutrophil chemotaxis is strongly influenced by mean IL-8 concentration. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;319(2):576-581.
- 122 **Ramos CD, Canetti C, Souto JT, Silva JS, Hogaboam CM, Ferreira SH, Cunha FQ.** MIP-1alpha[CCL3] acting on the CCR1 receptor mediates neutrophil migration in immune inflammation via sequential release of TNF-alpha and LTB4. *J Leukoc Biol.* 2005;78(1):167-177.
- 123 **Dinarello CA,** The biology of interleukin 1 and comparison to tumor necrosis factor. *Immunol Lett.* 1987 Dec;16(3-4):227-31.

-
- 124 **Denis M, Ghadirian E.** Interleukin-1 is involved in mouse resistance to *Mycobacterium avium*. *Infect Immun*. 1994;62(2):457-461.
- 125 **Granowitz EV, Clark BD, Mancilla J, Dinarello CA.** Interleukin-1 receptor antagonist competitively inhibits the binding of interleukin-1 to the type II interleukin-1 receptor. *J Biol Chem*. 1991;266(22):14147-14150.
- 126 **Kusner DJ.** Mechanisms of mycobacterial persistence in tuberculosis. *Clin Immunol*. 2005;114(3):239-247.
- 127 **Vergne I, Chua J, Lee HH, Lucas M, Belisle J, Deretic V.** Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(11):4033-4038.
- 128 **Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC.** Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*. 1998;92(9):3007-3017.
- 129 **Tapper H.** The secretion of preformed granules by macrophages and neutrophils. *J Leukoc Biol*. 1996;59(5):613-622.
- 130 **Tjelle TE, Lovdal T, Berg T.** Phagosome dynamics and function. *Bioessays*. 2000;22(3):255-263.
- 131 **Ricevuti G, Mazzone A, Fossati G, Mazzucchelli I, Cavigliano PM, Pasotti D, Notario A.** Assay of phagocytic cell functions. *Allerg Immunol (Paris)*. 1993;25(2):55-66.
- 132 **Bainton DF.** Distinct granule populations in human neutrophils and lysosomal organelles identified by immuno-electron microscopy. *J Immunol Methods*. 1999;232(1-2):153-168.
- 133 **Perskvist N, Roberg K, Kulyte A, Stendahl O.** Rab5a GTPase regulates fusion between pathogen-containing phagosomes and cytoplasmic organelles in human neutrophils. *J Cell Sci*. 2002;115(Pt 6):1321-1330.
- 134 **Matteoni R, Kreis TE.** Translocation and clustering of endosomes and lysosomes depends on microtubules. *J Cell Biol*. 1987;105(3):1253-1265.
- 135 **Niedergang F, Chavrier P.** Regulation of phagocytosis by Rho GTPases. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005;291:43-60.

Danksagung

Ich danke allen, die mich beim Anfertigen dieser Arbeit im Forschungsbau H1 des Universitätsklinikums Regensburgs unterstützt haben.

An erster Stelle danke ich Frau PD Dr. med Pia Hartmann, die mich als Betreuerin an das wissenschaftliche Arbeiten herangeführt und mich mit den Methoden und der Theorie vertraut gemacht hat. Sie ließ die gesamte Durchführung zu einer sehr interessanten und freudebringenden Zeit werden.

Herrn Dr. rer. nat. Nirmal Robinson aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Uniklinik Köln danke ich für seine Unterstützung bei der Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie.

Den technischen Assistentinnen Frau Frau Irina Fink und Frau Beate Syrzisko danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Felix Sperl
Geburtstag:	19.04.1980
Geburtsort:	Zwiesel
Wohnhaft in:	Neuschrenkenthal 24, 93470 Lohberg
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulbildung

09/1986 – 07/1990	Grundschule Lam
09/1990 – 07/1999	Benedikt-Stattler-Gymnasium Bad Kötzing

Zivildienst

08/1999 – 05/2000	Zivildienst am Klinikum Luitpold in Bad Kötzing
-------------------	---

Hochschulausbildung

10/2000 – 06/2001	Studium der Humanmedizin an der Universität Albert Szent-Györgyi in Szeged/Ungarn
10/2001 – 06/2008	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
06/2008	Ablegen des Staatsexamens mit Note „Gut“ (2,0)

Weiteres

10/2005 – 03/2006	Auslandssemester im Rahmen des Erasmus-Programms der Europäischen Union an der Università degli Studi di Verona und am Policlinico G.B. Rossi
08/2004 – 12/2007	Beschäftigung als studentische Hilfskraft in der Abteilung für Unfallchirurgie bei Prof. Dr. Michael Nerlich